

Postverlagsort Berlin

UNIVERSITY OF HAWAII  
LIBRARY

JUN 24 '64

# ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

BEGRÜNDET VON

J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

C. B. VAN NIEL  
PACIFIC GROVE

R. NILSSON  
UPPSALA

E. G. PRINGSHEIM  
GÖTTINGEN vorm. CAMBRIDGE

W. H. SCHOPFER  
BERN

H. TAMIYA  
TOKIO

UND DEN SCHRIFTFLEITERN

A. RIPPEL-BALDES  
GÖTTINGEN

R. HARDER  
GÖTTINGEN

24. BAND · 3. HEFT

MIT 45 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 22. MAI 1956)



SPRINGER-VERLAG

BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

1956

Arch.  
Mikrobiol.

Per.  
QR 1  
Ar 25

# Archiv für Mikrobiologie

Zeitschrift für die Erforschung der pflanzlichen Mikroorganismen. Begründet 1930  
von J. Behrens, F. Boas, A. Rippel. Berlin, Springer.

Das „Archiv für Mikrobiologie“ steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden.

Das „Archiv“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials. Der Preis des Bandes beträgt DM 96.—.

Der Autor erhält einen Unkostensatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 30.— für eine Arbeit. Sammelreferate werden mit DM 40.— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotos u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte erbeten an:

Prof. Dr. C. B. van Niel, California/USA, Pacific Grove, Stanford University, Hopkins Marine Station,

Prof. Dr. R. Nilsson, Uppsala 7/Schweden, Kungl. Lantbrukshögskolan, Mikrobiologiska Institutionen,

Prof. Dr. E. G. Pringsheim, Göttingen, Untere Karspüle, Pflanzenphysiologisches Institut,

Prof. Dr. W. H. Schopfer, Bern/Schweiz, Botanisches Institut der Universität,

Prof. Dr. H. Tamiya, Tokio/Japan, 41, Mejiro-Machi 4th St., The Tokugawa Institute for Biological Research,

oder an die

*Schriftleitung:*

Prof. Dr. A. Rippel-Baldes, Göttingen, Institut für Mikrobiologie, Goßlerstr. 16

Prof. Dr. R. Harder, Göttingen, Pflanzenphysiolog. Institut, Nikolausberger Weg 18

**Springer-Verlag**

Berlin · Göttingen · Heidelberg

## 24. Band

## Inhaltsverzeichnis

## 3. Heft

Seite

- KANDLER, O., C. ZEHENDER und J. MÜLLER, Weitere Untersuchungen über den Atmungsstoffwechsel von *Proteus vulgaris*, dessen stabiler L-Phase und der pleuropneumonie-ähnlichen Organismen. Mit 1 Textabbildung . . . 209
- KANDLER, O., C. ZEHENDER und J. MÜLLER, Vergleichende Untersuchungen über den Nucleinsäuren- und Atmungsstoffwechsel von *Proteus vulgaris*, dessen stabiler L-Phase und den pleuropneumonie-ähnlichen Organismen. Mit 11 Textabbildungen . . . 219
- KANDLER, O., J. MÜLLER und C. ZEHENDER, Über Veränderungen des Nucleinsäuregehaltes von *Proteus vulgaris* während der durch Penicillin ausgelösten Umwandlung in die L-Phase. Mit 9 Textabbildungen . . . 250
- PEYNAUD, E., et S. DOMERCQ, Sur les *Brettanomyces* isolés de Raisins et de Vins. Avec 14 figures dans le texte . . . 266
- BUKATSCH, F., Zur Analyse der Bakterienhemmstoffe aus der Wurzel vom Schöllkraut und ähnlichen Pflanzen. Mit 6 Textabbildungen . . . 281
- MEYER-PIETSCHMANN, K., Beobachtungen zum nicht-lytischen und lytischen Verhalten von Myxobakterien gegenüber anderen Mikroorganismen. Mit 3 Textabbildungen . . . 297
- GOODWIN, T. W., and D. G. LAND, The Carotenoids of Photosynthetic Bacteria. I. The nature of the carotenoid pigments in a halophilic photosynthetic sulphur bacterium (*Chromatium* spp.). With 1 figure in the text 305



(Aus dem Botanischen Institut der Universität München)

## Weitere Untersuchungen über den Atmungsstoffwechsel von *Proteus vulgaris*, dessen stabiler L-Phase und der pleuropneumonie-ähnlichen Organismen

Von

OTTO KANDLER, CLAUD ZEHENDER und JOHANNES MÜLLER

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 5. Januar 1956)

In Fortsetzung unserer Untersuchungen über den Stoffwechsel der L-Phasen und pleuropneumonie-ähnlichen Organismen (PPLO) führten wir einige Versuche über die Substratverwertung und Giftempfindlichkeit dieser Organismen aus. Frühere Untersuchungen (KANDLER u. Mitarb., 1956) hatten gezeigt, daß der oxydative Stoffwechsel, bezogen auf die Syntheseleistung, bei *P. vulgaris*, der stabilen L-Phase und den PPLO etwa den gleichen Umfang hat. Die im folgenden dargestellten Versuche sollten zeigen, ob sich zwischen diesen 3 Lebensformen qualitative Unterschiede im Atmungsstoffwechsel finden lassen, die sich in einem veränderten Substratbedürfnis bzw. anderer Empfindlichkeit gegenüber Atmungsgiften auswirken müßten. Derartige Versuche waren als Vorversuche für eine eingehendere fermentchemische Untersuchung gedacht.

### Material und Methode

Es wurden die gleichen Stämme verwendet wie bei den früheren (KANDLER u. KANDLER, 1955) Versuchen. Auch der Nährboden war derselbe (0,7% Pepton, tryptisch verdaut aus Fleisch; 0,5% Hefeextrakt, Cenovis, München; 0,1% Glucose; 0,3% NaCl, 0,2%  $K_2HPO_4$ , 1% Agar, 10% Pferdeserum;  $p_H = 7,8$ ). Für Flüssigkulturen wurde die Phosphatmenge vervierfacht. Im Gegensatz zu früher wuchs die stabile L-Phase von *Proteus vulgaris* nunmehr in dieser Nährlösung ausgezeichnet. Es mag sich um eine allmähliche Adaptation an die Nährbodenzusammensetzung im Laufe der vielen Passagen (bis jetzt 150) handeln. Die Stammkulturen wurden immer auf feste Nährböden weiterübertragen, während das Material für die Atmungsmessungen in je 300 ml Flüssigkeit herangezogen wurde. Bebrütungstemperatur 37° C. Die Beimpfung erfolgte durch Ausstreichen bzw. Hineinwerfen eines bewachsenen Agarstückes. Gelegentlich wurde auch direkt von Flüssig auf Flüssig weitergeimpft, doch ist dabei die Infektionsgefahr erheblich größer.

Die Ernte der Organismen erfolgte kurz nach Abschluß des Hauptwachstums; bei *P. vulgaris* nach 24 Std, bei der L-Phase und den PPLO nach 3—4 Tagen. Die Organismen wurden mit Hilfe einer hohtourigen Zentrifuge (Pirouette) sedimentiert (10 min bei 15 000 g), mit Aqua dest. ausgewaschen und dann zur Atmungsmessung verwendet. In ausführlichen Vorversuchen war festgestellt worden, daß bei allen 3 Organismen eine Puffermolarität von m/30—m/45 und ein  $p_H$  von 7,8—8,2 optimal



sind. Längerer Aufenthalt in diesen Phosphatpuffern schädigt die Organismen nicht. Dies wurde dadurch kontrolliert, daß in verschiedenen, gleichartig mit je 2 ml Suspension beschickten Atmungsströgen erst nach 1—8 Std Substrat zugegeben wurde. Bis zur 4. Std war der Atmungsanstieg nach Substratzugabe praktisch gleich stark und erst bei längerer Ausdehnung der Verarmung trat bei *L*-Phasen und PPLO eine Verminderung der Atmungsintensität ein. Bei *P. vulgaris* konnte die Verarmung sehr viel länger ausgedehnt werden.

Die Wirkung verschiedener Gifte auf das Wachstum wurde dadurch getestet, daß fester Nährboden mit entsprechenden Giftmengen versetzt und anschließend mit den Organismen beimpft wurde. Dabei wurden auf jede Platte 3 PPLO-Stämme und die *L*-Phase geimpft, so daß für alle gleiche Bedingungen vorlagen. *P. vulgaris* mußte wegen seines Schwärmvermögens auf eine eigene Platte geimpft werden. Nach 2 bzw. 4 Tagen wurde das Ergebnis abgelesen und der Bewuchs in einem relativen Maßsystem ausgedrückt. Wenn kein makroskopisch sichtbarer Bewuchs vorhanden war, wurde stets mit Hilfe des Stereomikroskopes kontrolliert, ob nicht doch kleine Kolonien gebildet worden waren.

Alle Atmungsmessungen wurden nach der manometrischen Methode (vgl. DIXON, 1953) durchgeführt. Die Bestimmung des Gesamtstickstoffes der Suspensionen erfolgte nach der Kjeldahlmethode (vgl. KLEIN, 1932). Die verwendeten Substrate wurden mit NaOH auf pH 7,8 eingestellt. Von den Säuren lagen also jeweils die Na-Salze vor.

## Versuchsergebnisse

### 1. Versuche über den oxydativen Abbau verschiedener Substrate

In einer früheren Mitteilung (KANDLER u. KANDLER, 1955) war gezeigt worden, daß sich die *L*-Phase von der Bakterienform in ihrer Fähigkeit zur Säurebildung aus verschiedenen Kohlenhydraten nicht unterscheidet. In vorliegender Arbeit wurde die nur qualitative bakteriologische Nachweismethode der Substratverwertung, die nur für Kohlenhydrate anwendbar und mit manchen Fehlermöglichkeiten behaftet ist, durch die manometrische Messung der Sauerstoffaufnahme nach Zugabe des betreffenden Substrates ersetzt.

Bekanntlich treten bei Bakterien sehr häufig Mutanten auf, die die Fähigkeit zur Verwertung eines bestimmten Substrates verloren, bzw. wieder erworben haben, und es wäre durchaus denkbar, daß bei der tiefgreifenden Umorganisation während der *L*-Umwandlung derartige Veränderungen in größerer Zahl vorkommen. Wir bestimmten daher die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme nach Zugabe der physiologisch wichtigsten Kohlenhydrate, organ. Säuren, Aminosäuren und Alkohole.

Von Ansatz zu Ansatz war der Absolutwert des  $NQO_2$  (Sauerstoffverbrauch je Stunde und mg Gesamt-N in mm<sup>3</sup>) selbst für gleiche Substrate recht verschieden, da Alter und Kulturbedingungen doch nicht immer völlig gleich gehalten werden können. Um einen besseren Vergleich zu ermöglichen, wurde daher immer eine Probe mit Pepton, das als günstigstes Substrat angesehen werden kann, mitgeführt und die Atmung mit den anderen Substraten in Prozenten der „Peptonatmung“ ausgedrückt. Von einer Suspension wurden stets möglichst viele Ansätze mit verschiedenen Substraten gleichzeitig gemacht (in der Regel 12), damit auf jeden Fall die relativen Werte für die Atmungsförderung richtig erhalten wurden.



Von allen Substraten wurden Konzentrationsabstufungen von m/100—m/10 untersucht. Die in Tab. 1 zusammengestellten Werte sind Höchstwerte. Besonders bei den org. Säuren können mit ungünstigerem Organismenmaterial wesentlich geringere Atmungssteigerungen gegenüber Pepton erhalten werden. Doch soll an dieser Stelle nicht auf die näheren Bedingungen, von denen die Umsatzgeschwindigkeit der verschiedenen Substrate abhängt, eingegangen werden.

Tabelle 1. Sauerstoffverbrauch in % der „Peptonatmung“ nach Zugabe verschiedener Substrate.  $p_H$  7,8;  $t = 27^\circ C$

Substrat	<i>Proteus vulgaris</i> %	L-Phase %	Substrat	<i>Proteus vulgaris</i> %	L-Phase %
Saccharose . . . . .	45	40	Asparaginsäure	60	50
Glucose . . . . .	45	50	Asparagin .	40	30
Dextrin . . . . .	2	10	Glutaminsäure	30	24
Stärke . . . . .	2	5	Leucin . . .	25	30
Maltose . . . . .	40	40	Methionin .	25	25
Fructose . . . . .	30	35	Tyrosin . . .	20	20
Lactose . . . . .	2	6	Alanin . . .	10	10
Galaktose . . . . .	45	35	Glykokoll . .	5	7
Ribose . . . . .	15	20			
Essigsäure . . . . .	80	100	Methanol . .	2	3
Ameisensäure . . . .	50	75	Äthanol . . .	5	5
Bernsteinsäure . . .	70	110	Butanol . . .	2	3
Milchsäure . . . . .	80	130	Glycerin . . .	30	23
Brenztraubensäure	30	14			
Äpfelsäure . . . . .	25	12	Leeratmung .		
Glykolsäure . . . . .	15	12	ohne Substrat	2—3	3—5
Propionsäure . . . .	2	5			
Malonsäure . . . . .	2	5			
Weinsäure . . . . .	2	5			

Wie Tab. 1 zeigt, besteht zwischen der Bakterienform und der L-Phase kein qualitativer Unterschied in bezug auf die Fähigkeit zur Oxydation verschiedener Substrate. Ein eindeutiger quantitativer Unterschied ergibt sich bei den niederen organischen Säuren, die im Vergleich zu den anderen Substraten von der L-Phase relativ besser umgesetzt werden, als von der Bakterienform. Die absolute Atmungsgeschwindigkeit ist aber bei der L-Phase erheblich niedriger. So schwankte der  $NQO_2$  der Peptonatmung bei der L-Phase zwischen 90 und 150, bei *Proteus* aber zwischen 600 und 1200. Mit optimalem Substrat und während der log-Phase des Wachstums liegen die Werte noch erheblich höher (KANDLER u. Mitarb., 1956).

Gleichartige Versuche mit PPLO-Stämmen lieferten ein völlig anderes Ergebnis (vorwiegend wurde der Stamm „Findlay“ verwendet). Wie schon früher ausgeführt (KANDLER u. KANDLER, 1955), wird von den

PPLO nur bei kombinierter Zugabe von Hefeextrakt, Pepton und Glucose eine kräftige Sauerstoffaufnahme erreicht. Dabei handelt es sich nicht um eine bloße Addition der bei Zugabe der einzelnen Substrate erreichten Atmung. Ohne Zusatz von anderen Substraten bewirkten nur Glucose, Maltose, Fructose, Galaktose und Cellobiose, letztere allerdings nur in sehr geringem Umfang, eine meßbare Atmungssteigerung in der ersten Stunde, die dann rasch wieder absank. Mannose, Sorbose, Rhamnose, Arabinose und Xylose waren wirkungslos. Ebenso wenig führten organische Säuren, Aminosäuren und Alkohole, von denen alle in Tab. I angeführten Vertreter in verschiedenen Konzentrationen untersucht wurden, zu einer Erhöhung der sehr geringen Leeratmung. In Verbindung mit Hefeextrakt war die atmungssteigernde Wirkung der Kohlenhydrate Glucose, Stärke, Galaktose, Laevulose, Fructose, Cellobiose (die Reihenfolge gibt die relative Wirksamkeit an) etwas stärker, die übrigen Substrate waren aber auch in diesem Falle wirkungslos.

In einigen Versuchen wurde die Wirkung verschiedener Vitamine, die als Cofermente für die Atmung bekannt sind, auf die Glucoseatmung untersucht. Es trat aber nur bei Verwendung von Ascorbinsäure eine wesentliche Steigerung der Sauerstoffaufnahme ein. Diese beruhte jedoch nicht auf einem verstärkten Glucoseumsatz, sondern nur auf einer Oxidation der Ascorbinsäure selbst. Bei anderen Vitaminen, wie B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, Pantothensäure, Folsäure, Biotin, usw. ergaben sich keine eindeutigen Förderungen.

Die Unfähigkeit unserer PPLO-Stämme, organische Säuren zu oxydieren, ist erstaunlich, da praktisch alle Bakterien einen Teil dieser Substrate recht rasch angreifen. Wie die oben geschilderten Versuche mit der L-Phase gezeigt haben, geht diese Fähigkeit bei der L-Umwandlung nicht verloren. Wenn also die PPLO, wie verschiedene Autoren annehmen (DIENES u. WEINBERGER, 1951, TULASNE, 1951, 1953), nur stabile L-Phasen sind, deren Bakterienform man nicht kennt, so müßte man als mutmaßliche Ausgangsformen nach Bakterien suchen, die sich ernährungsphysiologisch ähnlich verhalten. Es sei denn, daß man eine allmähliche Reduktion verschiedener Stoffwechselleistungen unabhängig vom eigentlichen Umwandlungsvorgang annimmt. Dafür liegen aber zunächst keine Anhaltspunkte vor.

## *2. Versuche über die Wirkung verschiedener Atmungsgifte*

Bei der Aufklärung des Atmungsstoffwechsels, wie sie in den letzten Jahrzehnten mit großem Erfolg vorangetrieben wurde, spielte die Verwendung verschiedener Gifte mit mehr oder weniger gut bekannter spezifischer Wirkung eine wesentliche Rolle. Durch kombinierte Anwendung derartiger Atmungsgifte sind wir heute in der Lage, eine Aussage darüber zu machen, ob bei einem Organismus der Atmungsstoffwechsel



über bestimmte, bereits bekannte Mechanismen verläuft oder ob andere Wege in Betracht gezogen werden müssen.

Wir prüften daher, ob *P. vulgaris*, dessen L-Phase und die PPLO von einer Reihe von Atmungsgiften in gleichem Umfang gehemmt werden oder ob einer dieser Organismen charakteristische Abweichungen aufweist. In Abb. 1 ist ein verkürztes Schema des Kohlenhydratabbaues nach dem bei den meisten Organismen realisierten Mechanismus dargestellt und der wahrscheinliche Ort des Eingriffes der einzelnen Gifte

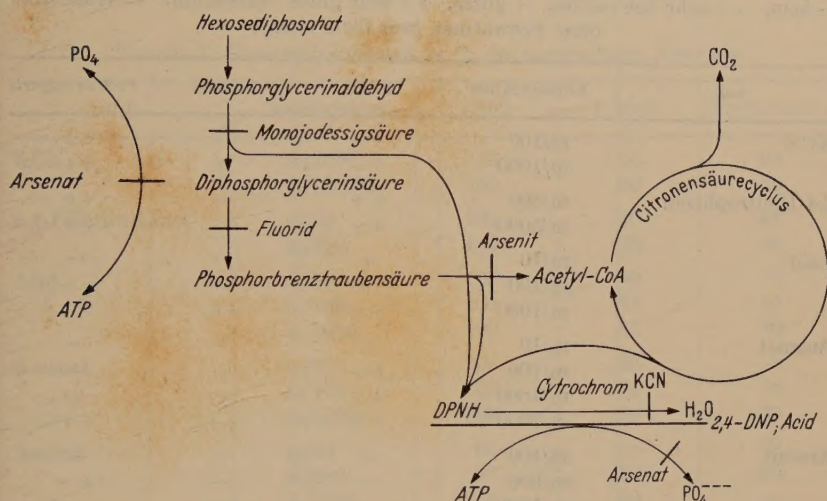


Abb. 1. Schema des Kohlenhydratabbaues mit Markierung der Angriffspunkte verschiedener Atmungsgifte

angegeben (vgl. JAMES, 1953). So greifen Monojodessigsäure und Fluorid im sogenannten EMBDEN-MEYERHOF-Schema ein, während Arsenit durch Blockierung der Liponsäure den Übertritt der Brenztraubensäure in den Citronensäurecyclus verhindert. KCN und Azid inaktivieren durch Komplexbildung das Fermenteisen der Cytochrom-a-Oxydase und greifen damit in die Atmungskette ein. Azid entkoppelt außerdem ebenso wie 2,4-Dinitrophenol (DNP) die mit dem Elektronentransport gekoppelte Atmungskettenphosphorylierung. Als universelles Phosphorylierungsgift, das auch die mit der Triosephosphatdehydrierung verbundene Substratphosphorylierung entkoppelt, wurde Arsenat verwendet.

Die Wirksamkeit dieser Gifte wurde in 2 Versuchsanordnungen festgestellt. Zunächst wurden Nährböden mit verschiedenen Giftzusätzen hergestellt und das Wachstum beobachtet. Das Ergebnis zeigt Tab. 2. Andererseits wurden aber auch manometrische Versuche ausgeführt, bei denen die aus Flüssigkeitskulturen geernteten Organismen zunächst mit

optimalem Substrat (normale Nährlösung) versetzt wurden und dann Zusätze von verschiedenen Giften erhielten. Der Sauerstoffverbrauch nach etwa einer Stunde (die Wirkung trat bei den verschiedenen Giften nach unterschiedlichen Zeiten ein), wenn die Giftwirkung voll zur Ausbildung gekommen war, ist in Prozent der unvergifteten Probe in Tab. 3 zusammengestellt.

Tabelle 2. *Wachstum auf festen Nährböden bei Zugabe verschiedener Atmungsgifte.*  
— kein, +— sehr schwaches, + gutes, ++ sehr gutes Wachstum. +o Wachstum ohne Schwärmen (nur für *Proteus*)

Gift	Konzentration	PPLO	L-Phase	<i>Proteus vulgaris</i>
KCN	m/100	++	—	++
	m/1000	++	+	++
2,4-Dinitrophenol	m/500	++	—	++
	m/5000	++	++	++
Azid	m/10	+	—	—
	m/100	++	+—	+—
	m/1000	++	++	++
Arsenat	m/10	+	—	—
	m/100	++	—	—
	m/1000	++	+	+o
	m/2000	++	++	++
Arsenit	m/100	+	—	—
	m/500	++	—	+—
	m/1000	++	+—	+
	m/10 000	++	++	++
Monojodessigsäure	m/200	—	—	+—
	m/500	—	—	+
	m/1000	—	—	++
	m/10 000	—	+	++
	m/20 000	—	++	++
	m/50 000	+	++	++
Fluorid	m/100 000	++	++	++
	m/10	—	+	++
	m/50	—	++	++
	m/100	—	++	++
	m/200	+	++	++
	m/500	++	++	++

Der Vergleich der beiden Tab. 2 und 3 zeigt gute Übereinstimmung. Der Wachstumstest ist naturgemäß wesentlich ungenauer als die Atmungsmessung, spricht aber schon auf geringere Konzentrationen an. Zwischen Bakterienform und der L-Phase bestehen nur quantitative Unterschiede in dem Sinne, daß die L-Phase im Wachstumstest meist



etwas empfindlicher ist. Deutliche graduelle Unterschiede in der Hemmung der Atmung ergaben sich bei Monojodessigsäure, die für die L-Phase erheblich stärker wirksam ist als für die Bakterienform und bei Arsenat und Azid, die beide eine geringere Wirkung auf die L-Phase ausüben. Wenn man bedenkt, daß die angeführten Werte bei verschiedenen Ansätzen durchaus um etwa  $\pm 10\%$  schwanken können, so kann man von einer guten grundsätzlichen Übereinstimmung sprechen. Es spricht jedenfalls nichts dafür, daß man für die L-Phasen einen anderen Mechanismus der Atmung annehmen muß wie für die Bakterienform.

Tabelle 3. Sauerstoffverbrauch in % der unvergifteten Kontrolle

Gift	Konzentration	PPLO	L-Phase	<i>Proteus vulgaris</i>
KCN	m/1000	150	35	62
	m/10 000	150	60	85
2,4-Dinitrophenol	m/50	100	20	48
	m/150	100	38	66
Azid	m/10	100	30	6
	m/100	100	75	16
	m/1000	100	85	70
Arsenat	m/10	100	55	—
	m/100	100	64	16
	m/1000	100	75	25
Arsenit	m/80	65	—	9
	m/500	75	35	26
	m/5000	100	60	—
Monojodessigsäure	m/500	—	25	46
	m/1000	—	32	75
	m/5000	11	48	90
	m/10 000	22	70	—
Fluorid	m/10	30	60	80
	m/50	50	100	100

Demgegenüber zeigen die PPLO, von denen insgesamt 8 verschiedene Stämme untersucht wurden, ein völlig anderes Verhalten. Sie sind in beiden Testen gegenüber Monojodessigsäure und Fluorid sehr empfindlich, werden aber von allen anderen Giften selbst in extrem hohen Konzentrationen nicht gehemmt. KCN führt sogar zu einer kräftigen Atmungsförderung. Eine Erklärung dieses mit geringen Konzentrationen auch bei anderen Organismen wiederholt beobachteten Effektes ist vorläufig noch nicht sicher möglich. Man kann daran denken, daß überschüssige Schwermetalle, die für die Atmung hemmend sind, von KCN gebunden werden, doch dürfte diese Erklärung für die recht hohen Konzentrationen von  $10^{-3}$  m nicht ausreichen.

Besonders erstaunlich ist auch die weitgehende Resistenz gegenüber Arsenat. Die Versuche wurden auf Nährböden durchgeführt, die keinen Phosphatzusatz enthielten, weil dieser die Arsenatwirkung aufheben würde. Völlig phosphatfrei waren die Nährböden allerdings nicht, da im Pepton große Mengen Phosphat enthalten sind. Allerdings reichen diese Phosphatmengen bei anderen Organismen bei weitem nicht aus, um eine Arsenathemmung aufzuheben, wie die Befunde an *Proteus* zeigen.

Insgesamt muß aus dem Verhalten der PPLO gegenüber den Atmungs- giften der Schluß gezogen werden, daß sie bei ihrem aeroben Stoffwechsel weder auf das Cytochromsystem, noch auf den Citronensäurecyclus angewiesen sind. Für letzteres spricht neben der Unempfindlichkeit gegenüber Arsenit auch das Unvermögen zur Oxydation organischer Säuren. Es hat auch den Anschein, daß die üblichen Phosphorylierungsmechanismen ganz fehlen oder zumindest extrem verschobene Gleichgewichte aufweisen, weil sonst eine derartig weitgehende Resistenz gegenüber Arsenat, DNP und Azid unverständlich wäre. Demgegenüber scheint das EMBDEN-MEYERHOF-Schema eine entscheidende Rolle zu spielen, da sowohl Monojodessigsäure, als auch Fluorid so ungewöhnlich stark wirksam sind.

### Diskussion

Sowohl die Versuche über die Substratverwertung, als auch die über die Giftempfindlichkeit sprechen dafür, daß sich bei der L-Phasen-Umwandlung keine qualitative Veränderung des Atmungsstoffwechsels vollzieht. Die L-Phasen verfügen mit großer Wahrscheinlichkeit über die gleichen Atmungsfermente wie die Ausgangsbakterien. Eine allmähliche Veränderung durch fortlaufende Passagenkultur in der L-Phase konnte im Laufe der bisherigen 150 Passagen nicht beobachtet werden.

Die PPLO-Stämme verfügen demgegenüber mit Sicherheit über einen anderen Abbauweg und insbesondere über ein anderes Endoxydasesystem. Sie sind durch das Unvermögen organischer Säuren und Aminosäuren oxydativ abzubauen und durch die Resistenz gegen eine Reihe von Atmungsgiften außerordentlich gut charakterisiert und von den üblichen Bakterien deutlich unterschieden. Wir untersuchten vergleichsweise eine Reihe häufiger Bakterien wie *E. coli*, *Pseudomonas*-Arten, *Flavobacterium spec.*, *Achromobacter spec.*, *Micrococcus spec.*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis* und *mesentericus*, *Bacterium linens* und *Caulobacter vibrioides* auf ihre Giftempfindlichkeit und fanden in keinem Falle ein ähnliches Verhalten wie bei den PPLO, wenn auch die einzelnen Formen jeweils durch Resistenz gegen einzelne Gifte voneinander abwichen. Besonders auffällig war die Resistenz von *Sarcina* gegen Arsenat, die genau so weitgehend wie bei den PPLO war. Allerdings



war *Sarcina* im Gegensatz zu den PPLO gegenüber Azid und Arsenit sehr empfindlich.

Die Identität des Atmungsstoffwechsels von L-Phase und Bakterienform einerseits, und die Sonderstellung der PPLO in bezug auf den Atmungsstoffwechsel andererseits, scheint uns ein wichtiger Gesichtspunkt für die Beantwortung der oben angeschnittenen Frage nach den Beziehungen zwischen L-Phase und PPLO zu sein. Es erscheint uns sowohl auf Grund der hier als auch schon früher (KANDLER u. KANDLER, 1955, KANDLER u. Mitarb., 1956) vorgelegten Befunde für sehr wahrscheinlich, daß es sich bei den PPLO um eine selbständige Organismenklasse handelt und nicht um stabile L-Phasen. Zumindest nicht um L-Phasen, die in jüngster Vergangenheit, vielleicht Monate oder Jahre, entstanden sind, denn in diesen Zeiträumen sind nachträgliche stoffwechselphysiologische Veränderungen an L-Phasen nicht beobachtbar. Eine Entstehung aus Bakterien vor längeren Zeiträumen und damit ein phylogenetischer Zusammenhang zwischen Bakterien und PPLO ist natürlich durchaus denkbar, doch dann besteht keine Veranlassung, sie noch als L-Phasen zu bezeichnen. Sie stellen dann ebenso eine eigene systematische Einheit dar wie andere phylogenetisch verwandte und auseinander entstandene Gruppen von Organismen.

Die bisherigen Versuche über den Atmungsstoffwechsel der L-Phasen lassen es wenig aussichtsreich erscheinen, die Ursachen der in ihrem Wesen noch recht wenig verstandenen L-Umwandlung in einer Veränderung der Atmungsfermente zu suchen. Dagegen dürften die PPLO ein dankbares Objekt für eingehendere enzymologische Untersuchungen des Atmungsstoffwechsels darstellen.

### Zusammenfassung

Es wurde durch manometrische Atmungsmessung festgestellt, daß die stabile L-Phase von *Proteus vulgaris* die gleichen Substrate (verschiedene Kohlenhydrate, organische Säuren, Aminosäuren und Alkohole) oxydieren bzw. nicht oxydieren kann wie die Bakterienform, aus der sie isoliert wurde. Auch die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Atmungsgiften ist von kleineren graduellen Abweichungen abgesehen die gleiche.

Demgegenüber vermögen die PPLO, von denen 8 Stämme mit völlig gleichem Ergebnis untersucht wurden, nur einige Kohlenhydrate in geringem Umfang zu oxydieren, aber keine organischen Säuren, Aminosäuren und Alkohole. Sie sind außerdem gegenüber hohen Dosen von KCN, DNP, Azid, Arsenit und Arsenat völlig resistent und zeigen damit an, daß sie zumindest teilweise ein anderes Fermentsystem für den Substratabbau besitzen wie die meisten bisher untersuchten Organismen. Die

hohe Empfindlichkeit gegenüber Monojodessigsäure und Fluorid läßt vermuten, daß der Abbau bis zur Brenztraubensäure über das EMBDEN-MEYERHOF-Schema verläuft.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

### Literatur.

DIENES, L., and H. J. WEINBERGER: *Bacter. Rev.* **15**, 245 (1951). — DIXON, M.: *Manometric methods*. Cambridge 1951. — JAMES, W. O.: *Annual. Rev. Plant Physiol.* **4**, 59 (1953). — KANDLER, O., u. G. KANDLER: *Zbl. Bakter. II. Abt.* **108**, 383 (1955). — KANDLER, O., C. ZEHENDER u. J. MÜLLER: *Arch. Mikrobiol.* 1956 (im Druck). — KLEIN, G.: *Handbuch der Pflanzenanalyse*. Wien 1931. — TULASNE, R.: *Rev. d'Immun.* **15**, 223 (1951). — *Symposium Citol. Batterica* (1953).



(Aus dem Botanischen Institut der Universität München)

## Vergleichende Untersuchungen über den Nucleinsäuren- und Atmungsstoffwechsel von *Proteus vulgaris*, dessen stabiler L-Phase und den pleuropneumonie-ähnlichen Organismen\*

Von

OTTO KANDLER, CLAUD ZEHENDER und JOHANNES MÜLLER\*\*

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 16. Dezember 1955)

Die Umwandlung der Bakterienzelle in die L-Form, wie sie von KLIENEGER (1935) und DIENES (1939, 1949) entdeckt worden ist, stellt eine der tiefstgreifenden Umorganisationen der Zelle dar, die wir heute kennen. Sie ist ihrem Umfang nach vielleicht nur noch mit der Transformation einer normalen Gewebezelle in eine Tumorzelle vergleichbar, bietet aber dieser gegenüber wesentlich günstigere Voraussetzungen einer experimentellen Bearbeitung.

Über die morphologischen Veränderungen der Bakterienzelle bei der L-Umwandlung liegt bereits eine große Zahl von Arbeiten vor (DIENES u. SMITH, 1944, STEMPEN u. HUTCHINSON, 1951, v. PRITZWITZ u. GAFFRON, 1953, HÖPKEN u. BARTMANN, 1955, GRASSET u. BONIFAS, 1955). Alle Beobachtungen zeigen übereinstimmend die starke Aufblähung der Zellen, die mit einer Vermehrung der Kernsubstanz verbunden ist (TULASNE, 1949, SCHELLENBERG, 1954, KELLENBERGER u. LIEBERMEISTER, 1955). Von diesen polynuclearen „large bodies“ knospen dann nach mehreren Richtungen die Tochterorganismen aus (HÖPKEN u. BARTMANN, 1955), die auch bei der weiteren Vermehrung in dieser L-Form an Stelle der streng polaren Zweiteilung eine multipolare Knospung (KANDLER u. KANDLER, 1954) zeigen.

Diese starken Eingriffe in das Zellgefüge können unter bestimmten Bedingungen auch die genetische Substanz betreffen und eine derartige irreversible Veränderung hervorrufen, daß eine Rückkehr in die Bakterienform selbst nach Tausenden von Generationen nach Aufhören der Einwirkung des modifizierenden Agens (meist Penicillin) nicht mehr möglich ist (KANDLER u. KANDLER, 1956). Demgegenüber behält ein anderer L-Phasen-Typ die Fähigkeit zur Regeneration in die klassische Bakterienform auch über zahlreiche Penicillinpassagen hin bei, obwohl

---

\* Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

\*\* Die Arbeit ist im wesentlichen ein Auszug aus der von Herrn C. ZEHENDER vorgelegten Dissertation der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München.

er die gleichen morphologischen Umgestaltungen aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich eine stabile L-Phase benützt, da sie als die vollkommenste Umwandlungsstufe angesehen werden muß.

Im Gegensatz zu morphologischen Arbeiten sind physiologische Untersuchungen über die L-Phasen sehr spärlich, obwohl zweifellos nur die Kenntnis der physiologischen Veränderungen in der Zelle zu einem kausalen Verständnis des Gesamtphänomens führen kann. Wenn auch im Atmungsstoffwechsel, in bezug auf die Verwertung verschiedener Kohlenhydrate und das Vorkommen von Oxydasen zwischen der Bakterien- und der L-Form von *Proteus vulgaris* kein qualitativer Unterschied besteht (KANDLER u. KANDLER, 1955), so zeigt die Unempfindlichkeit der L-Phase gegenüber Penicillin und der Verlust der Fähigkeit zur Gelatineverflüssigung und zum Wachstum auf einfachen Substraten doch eine wesentliche Veränderung des Stoffwechsels an. In die gleiche Richtung weist der Befund von VENDRELY u. TULASNE (1953), daß der Lipidgehalt der L-Phase weit über dem der Bakterienform liegt. Außerdem stellten diese Autoren fest, daß bei 3 Wochen alten L-Phasenkulturen von *P. vulgaris* im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Bakterien der Gehalt an Desoxy-ribonucleinsäure (DNS) höher ist als der an Ribonucleinsäure (RNS).

Die vielen Untersuchungen der letzten Jahre über den Nucleinsäuregehalt von Bakterien haben aber gezeigt, daß sowohl der Gesamtanteil der Nucleinsäuren (NS) an der Bakterienmasse als auch das Verhältnis RNS/DNS in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand starken Schwankungen unterworfen sind (MALMGREEN u. HEDEN, 1947a, b, c, d, e; MORSE u. CARTER, 1949; BELOZERSKY, 1947; COHEN, 1947; SHERRATT u. THOMAS, 1953; WELLERSON u. TETRAULT, 1955). Ein Vergleich des NS-Gehaltes zweier verschiedener Formen ist daher nur möglich, wenn man sowohl die beiden NS, als auch den Eiweißgehalt über einen ganzen Entwicklungszyklus hinweg verfolgt und nicht nur mehr oder weniger gut definierte Phasen herausgreift.

Häufig werden die L-Formen der Bakterien mit den pleuropneumonie-ähnlichen Organismen (PPLO) in Verbindung gebracht, da sie ihnen nicht nur morphologisch stark gleichen, sondern sich auch wie diese durch multipolare Knospung vermehren (KANDLER u. KANDLER, 1954). Über den NS-Gehalt der PPLO liegt bisher nur eine vorläufige Mitteilung GERBERS (1955) vor, der einen Gesamt-NS-Gehalt von 20% fand, wobei je die Hälfte RNS bzw. DNS sein soll. Allerdings wurden auch diese Bestimmungen nur an älteren Kulturen vorgenommen.

Die Absicht vorliegender Arbeit ist es, durch quantitative Bestimmung von NS, Eiweiß und Atmungsintensität während des Wachstums von *P. vulgaris*, dessen stabiler L-Phase und einem PPLO-Stamm einen



weiteren Beitrag zur Frage nach den physiologischen Grundlagen der L-Phasenumwandlung und den eventuellen Beziehungen zwischen L-Phase und PPLO zu liefern.

### Material und Methodik

a) *Die Organismen.* Verwendet wurde der *Proteus*-Stamm Dienes 52 und eine von SEIFFERT mit Hilfe von Penicillin daraus isolierte stabile L-Phase, die sich nunmehr schon über 150 Passagen auf penicillinfreiem Nährboden ohne Rückschlagen in die Bakterienform kultivieren ließ. Sie entspricht dem Typ A nach DIENES (1949) und KANDLER u. KANDLER (1956). Von den verschiedenen zur Verfügung stehenden PPLO-Stämmen, die sich bei früheren Untersuchungen (KANDLER u. KANDLER, 1955) als physiologisch sehr einheitlich erwiesen hatten, wurde der im Flüssigen besonders gut wachsende Stamm „Findlay“ (von FINDLAY aus Mäusen isoliert) für die folgenden Versuche benützt.

b) *Die Nährböden und Kulturmethoden.* Alle 3 Organismen wurden auf dem gleichen Nährboden, den SEIFFERT (persönliche Mitteilung) für die PPLO entwickelt hat, kultiviert (0,7% Pepton Merck aus Fleisch (tryptisch verdaut), 0,2% Glucose, 0,5% Hefeextrakt (Cenovis, München), 0,3% Kochsalz, 0,1%  $K_2HPO_4$ , 10% Pferdeserum; pH 7,8). Für PPLO und L-Phase wurden 1%, für *Proteus* 1,5% Agar zugesetzt. Die Bebrütungstemperatur betrug allgemein 37° C; nur für die Schüttelkulturen 27° C.

Für die Flüssigkeitskulturen erwies sich ein erhöhter Phosphatzusatz (0,8%) als günstig. In dieser Lösung entwickelte sich auch die L-Phase, die ursprünglich im Flüssigen nicht wuchs, sehr gut. Als Kulturgefäße dienten bei den Standkulturen Steilbrustflaschen mit 500 ml Inhalt, bei den Schüttelkulturen FERNBACH-Kolben mit 1½ l Fassungsvermögen, die wegen ihrer großen Flüssigkeitsoberfläche eine besonders gute Durchmischung und damit auch Durchlüftung ermöglichten.

Die Stammkulturen wurden in Abständen von 3—4 Tagen von Platte zu Platte überimpft, wobei die Übertragung von PPLO und L-Phase stets durch Ausmieren eines bewachsenen Agarstückes vorgenommen wurde. Das Versuchsmaterial selbst wurde nur in flüssigen Nährböden herangezogen. Dazu erfolgte die Beimpfung entweder mit einem bewachsenen Agarstück oder mit der aus 300 ml (für *Proteus* 50 ml) steril abzentrifugierten Organismenmasse einer herangewachsenen Kultur.

Da bei der Hitzesterilisation der Flüssigkeitsnährböden Trübungen auftraten, die beim Abzentrifugieren der Kulturen mit den Bakterien sedimentiert worden wären, wurden sie mit Hilfe eines Seitz-Entkeimungsfilters unter Druck steril filtriert.

c) *Der Fraktionierungsgang.* Die Organismen wurden mit einer hochtourigen Zentrifuge 10 min bei 12 000 g abzentrifugiert und 2mal mit Aqua dest. auf der Zentrifuge gewaschen. Während bei *Proteus* das Auswaschen ohne Gefahr von Verlusten vorgenommen werden kann, ist bei den wesentlich fragileren L-Phasen und PPLO Vorsicht geboten, worauf auch GERBER (1955) hinweist. Wie die Tab. 1 zeigt, ergibt sich bei Verwendung von jungen PPLO praktisch kein Verlust an Nucleinsäure, während bei älteren bis zu 15% verloren gehen können. Das RNS/DNS-Verhältnis bleibt allerdings trotz den Verlusten, die durch platzende Organismen verursacht sein dürften, gleich. Demgegenüber sind bei der L-Phase auch schon junge Kulturen gegen das Auswaschen empfindlich, wie die NS-Verluste in Tab. 2 zeigen. Daher wurden die L-Phasen in den meisten Fällen nicht ausgewaschen, sondern nach dem ersten Abzentrifugieren sofort der Extraktion unterworfen. Damit entfiel allerdings die Möglichkeit der exakten Gesamtstickstoffbestimmung,

da die Ausgangsprobe noch Nährbodenreste enthielt. Auch die erste Fraktion der löslichen N- und P-Verbindungen war unbrauchbar.

Für die Extraktion der NS aus Mikroorganismen liegen heute bereits eine Reihe von Vorschriften vor, die kürzlich HEILINGER (1954) zusammenstellte, so daß sich eine erneute Aufzählung erübrigt. Allgemein wird zunächst durch einen Trichlor-essigsäure(TES)extrakt eine wasserlösliche Fraktion abgetrennt und das Eiweiß

Tabelle 1.

*Nucleinsäuregehalt von 2 bzw. 14d alten PPLO nach wiederholter Auswaschung*

Zahl der Auswaschungen	2 Tage alt			14 Tage alt		
	0	1	3	0	1	3
RNS [ $\gamma$ ] . . . . .	525	516	510	136	115	104
DNS [ $\gamma$ ] . . . . .	169	166	164	71,5	60	54
RNS/DNS . . . . .	3,11	3,12	3,11	1,9	1,92	1,92
— $\text{mm}^3 \text{O}_2$ 1 ml Susp. · 3Std . . . . .	217	210	204	—	—	—

Tabelle 2. *Nucleinsäuregehalt von 4d alten L-Phasen nach wiederholter Auswaschung*

Zahl der Auswaschungen	0	1	2
RNS [ $\gamma$ ] . . . . .	335	252	172
DNS [ $\gamma$ ] . . . . .	116	108	79
RNS/DNS . . . . .	2,89	2,33	2,18
— $\text{mm}^3 \text{O}_2$ 1 ml Susp. · 85 min	189	137	110

gefällt. Nach einer Extraktion der Lipide erfolgt dann die Spaltung der NS durch heiße TES oder Perchlorsäure, so daß die Bruchstücke ebenfalls in Lösung gehen und bestimmt werden können. Als letzte Fraktion verbleibt dann das Eiweiß. Im einzelnen verfahren wir folgendermaßen:

Die abzentrifugierte Organismenmasse wurde in 10 ml Aqua dest. suspendiert und davon je 1 ml zur Atmungsmessung, Stickstoff- und Phosphatbestimmung (die beiden letzteren in Parallelproben) verwendet. Die restlichen 5 ml wurden dann mit 0,5 ml 60% iger TES versetzt und unter Eiskühlung 10 min extrahiert; dann abzentrifugiert und mit 2 ml 6% iger TES nachgewaschen. Der vereinigte TES-Extrakt wurde je zur Hälfte zur Phosphat- und Stickstoffbestimmung verwendet. Der Niederschlag wurde mit einem Äthanol-Äthergemisch bei 50° C ausgezogen, um alle Lipide zu entfernen. Vor dem Zentrifugieren wurde das verdunstete Gemisch jeweils nachgefüllt. Nach zweimaligem Auswaschen mit frischem Gemisch wurde im vereinigten Extrakt wiederum der Phosphatgehalt bestimmt und der Niederschlag mit 0,5 n Perchlorsäure bei 75° C 30 min extrahiert. Wiederum nach Nachwaschen erfolgte im Extrakt in Parallelproben die Bestimmung von Ribose, Desoxyribose und Phosphat. Der unlösliche Rest enthält praktisch nur noch Eiweiß. Die N-Bestimmung aus dieser Fraktion ergibt somit den Eiweißgehalt. Neben N wurde im Schwefelsäureaufschluß auch das Rest- $\text{PO}_4$  bestimmt. Die Addition aller in den einzelnen Fraktionen bestimmten Phosphatmengen ergibt dann den Gesamtphosphatgehalt, der in 2 Parallelproben auch zu Beginn der Fraktionierung am



Ausgangsmaterial bestimmt worden war. Der Vergleich der beiden Werte ermöglicht eine Kontrolle, ob bei der Aufarbeitung Verluste eingetreten sind. Weiterhin läßt sich der Eiweißstickstoff mit guter Annäherung durch Subtraktion des NS- und TES-Stickstoffes vom Gesamtstickstoff errechnen und mit dem tatsächlich bestimmten Rest-N vergleichen. Sowohl die Kontrolle der  $PO_4$ -Bilanz, wie der Vergleich von errechnetem und praktisch bestimmtem Eiweiß-N ergaben eine sehr gute Übereinstimmung. Ein Schema des Fraktionierungsganges zeigt Abb. 1.

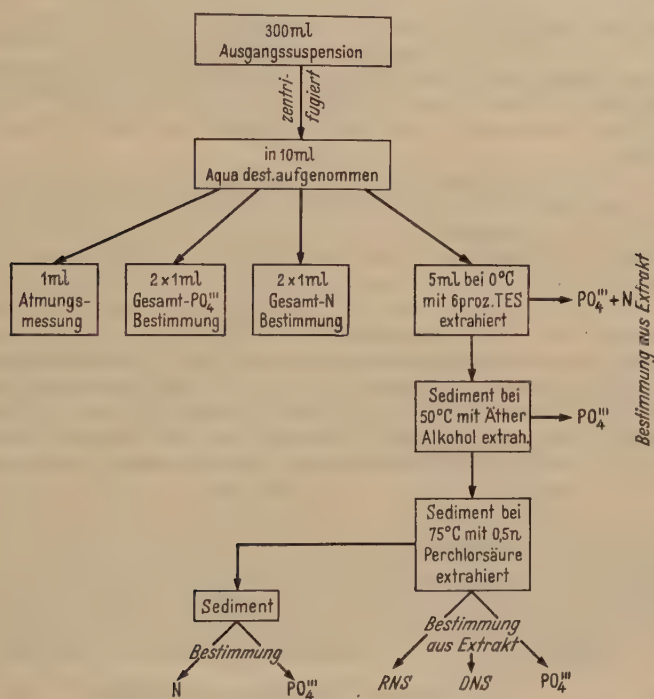


Abb. 1. Schema des Fraktionierungsganges

d) *Die Analysenverfahren.* 1. Stickstoffbestimmung: Es wurde das Mikro-Kjeldahlverfahren benützt (vgl. KLEIN, 1932). Aufschluß mit  $H_2SO_4$  unter Zusatz eines Gemisches von  $CuSO_4$  und  $K_2SO_4$  (1 : 2) und einiger Tropfen Perhydrol. Titration der vorgelegten n/50 HCl mit n/50 NaOH. Eichung mit eingewogenen Mengen Harnstoff.

2. Phosphatbestimmung: Verfahren nach MARTLAND u. ROBINSON (1928). Nach Aufschluß mit 1 ml 30% iger  $H_2SO_4$  wurde 1 ml Ammonmolybdat (10%) und 1 ml einer Lösung von 20 g wasserfreiem Natriumbisulfat und 0,5 g Hydrochinon in 100 ml Wasser zugegeben und auf 15 ml aufgefüllt. Nach 30 min wurde die Blaufärbung bei 587 m $\mu$  gemessen und an Hand einer Eichkurve der  $PO_4$ -Gehalt abgelesen.

3. RNS-Bestimmung nach HAHN u. EULER (1946): Sie beruht auf der Reaktion der Ribose mit Phloroglucin und Eisessig, wobei eine blaugrüne Färbung entsteht, die durch Fe(III)chlorid noch vertieft werden kann. 1 Teil der Untersuchungslösung wurde mit 4 Teilen einer Lösung von 0,42 g  $FeCl_3$  in 360 ml Eisessig

und 60 ml HCl (konzentriert) versetzt, 25 min im kochenden Wasserbad erhitzt und rasch abgekühlt. Nach Zugabe von 1 Teil einer Lösung von 1 g Phloroglucin in 100 ml konz. HCl, 100 ml Wasser und 200 ml Eisessig wurde 20 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen und dann erneut 20 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Die Farbtintensität konnte dann bei 587 m $\mu$  gemessen werden. Eine Eichkurve wurde aus eingewogenen Mengen Hefenucleinsäure (Merck) aufgestellt und daraus die RNS-Werte entnommen.

4. DNS-Bestimmung nach DISCHE: Auch dabei handelt es sich um die Bestimmung der Kohlenhydratkomponente. Dazu wird 1 Teil der Untersuchungslösung mit einem Teil einer Lösung von 1 g Diphenylamin in 100 ml Eisessig und 2,5 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt und 20 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen wird die Blaufärbung bei 587 m $\mu$  gemessen. Die DNS-Werte wurden wiederum einer mit reiner DNS aus Fischspermien (Merck) aufgestellten Eichkurve entnommen.

5. Atmungsmessungen: Es wurde die direkte manometrische Methode nach WARBURG (vgl. DIXON, 1952) verwendet. Das Volumen der Gefäße lag zwischen 15 und 25 ml. Zur Absorption des CO<sub>2</sub> wurde 5%ige KOH benützt. Zur sterilen Kultur standen kegelförmige Gefäße, die unterhalb des Schliffes eine kropffartige Erweiterung zur Aufnahme eines Wattebauschs hatten, zur Verfügung. Sie wurden vor dem Einfüllen der Suspensionen im Dampftopf unter 1 Atm. Druck sterilisiert.

6. Messung der Suspensionsdichte: Die Trübung der Suspensionen geht bis zu einem gewissen Grade der Keimzahl parallel. Sie wurde durch Messung der Gesamtschwächung eines Lichtstrahls von 587 m $\mu$  bei Durchgang durch 1 cm Schichtdicke bestimmt. Da sich durch pH-Änderungen die Färbung der Nährlösung während des Wachstums veränderte, wurde nach jeder Messung abzentrifugiert und die Extinktion der reinen Nährlösung von der Gesamttextinktion abgezogen.

7. Die Fehlergrenzen: Alle verwendeten Methoden sind natürlich mit gewissen Fehlern behaftet, die sich im Gesamtarbeitsgang teilweise wieder kompensieren. Um einen Überblick über die erzielbare Genauigkeit bei der Bestimmung der einzelnen Fraktionen und der Bildung der verschiedenen Quotienten zu erhalten, wurden aus einer 24stündigen, bereits in der stationären Phase befindlichen *Proteus*-Kultur 12 Proben zu je 50 ml entnommen und nach dem oben beschriebenen Schema (Abb. 1) aufgearbeitet. Aus den Werten wurde der Mittelwert gebildet und die Streuung  $\left(\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum d^2}{n-1}}\right)$  errechnet. Die Bildung der Quotienten wurde nicht aus den Mittelwerten, sondern aus den Einzelwerten vorgenommen und erst dann aus den 12 Einzelquotienten Mittelwert und Streuung berechnet.

Tab. 3 enthält die Ergebnisse. Während die meisten Werte nur sehr geringe Streuungen unter 3% aufweisen, liegen sie bei den absolut recht kleinen Fraktionen wie TES- und Lipoidextrakt um 10%. Auch die DNS-Bestimmung weist in diesem Falle eine Streuung von 6,8% auf, da in den verwendeten ruhenden Bakterien nur eine relativ geringe Menge an DNS enthalten war. In allen Proben mit größeren DNS-Mengen war die Streuung in der gleichen Größenordnung wie die der RNS. Der für unsere Betrachtung besonders wichtige Quotient RNS/DNS weist eine recht geringe Streuung von nur 2,8% auf.

Bei der Betrachtung der Tab. 3 ist zu bedenken, daß es sich dabei nur um die Streuung der methodischen Fehler, nicht um die Variationsbreite des Materials handelt. Bei Entnahmen aus verschiedenen Suspensionen, deren physiologischer



Zustand wohl nie völlig identisch ist, überlagern sich diesen Fehlern der Methodik auch die biologischen Fluktuationen, so daß sich erheblich größere Streuungen ergeben müssen.

In den folgenden Darstellungen sind immer Kurven eines typischen Einzelversuches verwendet. Eine Mittelwertbildung aus den verschiedenen Ansätzen ist für die Absolutwerte sinnlos, da sie kein echtes Kollektiv im Sinne der Statistik darstellen. Sowohl Einimpfmenge als auch Wachstumsgeschwindigkeit sind bei den

Tabelle 3. Übersicht über die Fehlergrenzen der quantitativen Bestimmungen in den einzelnen Fraktionen.

Die Werte sind aus 12 Parallelproben einer 48 Std alten *Proteus*-Kultur gewonnen

	N ges. [γ]	PO <sub>4</sub> ''' ges. [γ]	PO <sub>4</sub> ''' TES [γ]	PO <sub>4</sub> ''' Lipoid [γ]	PO <sub>4</sub> ''' Nucl.s. [γ]	DNS [γ]	RNS [γ]	N TES [γ]	N Eiweiß [γ]
Mittelwerte	1022	350	32	26	288	323	1085	84	714
σ . .	± 25	± 9	± 3	± 3	± 4	± 22	± 16	± 10	± 17

Tab. 3 (Fortsetzung)

PO <sub>4</sub> ''' ges. Eiweiß-N [γ/mg]	PO <sub>4</sub> ''' TES Eiweiß-N [γ/mg]	PO <sub>4</sub> ''' Lipoid Eiweiß-N [γ/mg]	PO <sub>4</sub> ''' Nucl.s. Eiweiß-N [γ/mg]	DNS Eiweiß-N [γ/mg]	RNS Eiweiß-N [γ/mg]	RNS DNS	N TES Eiweiß-N [γ/mg]	Ex- tinktion
490 ± 24	50 ± 4	36 ± 4	403 ± 17	448 ± 33	1510 ± 56	3,40 ± 0,094	117 ± 15	50,1 ± 0,3

einzelnen Ansätzen etwas unterschiedlich, so daß sich für die verschiedenen Entnahmen zu bestimmten Zeiten unterschiedliche Absolutwerte ergeben müssen. Für unsere Betrachtung sind der Kurvenverlauf und die erreichten Maxima der abgeleiteten Werte (z. B. RNS/DNS) von Bedeutung. Für sie ist neben der allgemeinen Kurvendarstellung der Mittelwert (mit Streuung) aus allen untersuchten Ansätzen in einer Tabelle angegeben.

Versuchsergebnisse

1. Versuche mit Normalformen von *Proteus vulgaris*

Zunächst wurde eine Öse einer 48ständigen *Proteus*-Kultur in 1 l Nährlösung eingepft und auf der Schüttelmaschine bei 27° C bebrütet. Die erste Probeentnahme (100 ml) erfolgte nach Auftreten einer kräftigen Trübung und von da an in Abständen von zunächst einigen Stunden und später von Tagen. Die Werte für den NS-Gehalt und den Quotienten RNS/DNS waren bei diesen Ansätzen gleich bei der ersten Probe am höchsten und fielen dann stark ab. Vom 2. Tag an blieben sie weitgehend konstant. Um den Übergang von der stationären in die logarithmische Phase zu erfassen, waren Ansätze mit so geringen Einimpfmengen nicht geeignet, und es wurden daher in Zukunft aus einer stationär gewordenen Flüssigkeitskultur 50 ml steril abzentrifugiert und die gesamte

Bakterienmasse in 1 l frische Nährlösung eingimpft. An einer Parallelprobe aus der Ausgangskultur wurden die Anfangsmengen an NS und Eiweiß bestimmt. Bei diesen Ansätzen mit großem Inoculum ist die eigentliche streng logarithmische Phase sehr kurz. Sicherlich wächst auch ein Teil der eingepfachten Bakterien nicht weiter und verfälscht dadurch die Ergebnisse für die log-Phase. Daher wurde in anderen Ansätzen aus der log-Phase erneut eine größere Menge in frische Nährlösung überimpft. Ebenso wurde unmittelbar nach Erreichen der stationären Phase eine Überimpfung vorgenommen. So konnte eine wesentliche Verlängerung der log-Phase und damit die sichere Bestimmung der NS-Maxima erreicht werden.

Tabelle 4. Übersicht über die Veränderung der stofflichen Zusammensetzung von *P. vulgaris* während der Entwicklung

Zeit [h]	Ex- tink- tion	N ges. [γ]	PO <sub>4</sub> '' ges. [γ]	PO <sub>4</sub> '' TES [γ]	PO <sub>4</sub> '' Lipoid [γ]	PO <sub>4</sub> '' Nucl.s. [γ]	DNS [γ]	RNS [γ]	N TES [γ]
0	6,9	44	18	3	2	15	13	55	3
0,5	9,4	125	62	6	5	55	36	213	13
1,5	18,5	357	198	14	14	170	89	695	27
2,5	33,0	740	382	32	29	346	172	1370	50
4,0	55,9	1400	688	80	58	543	324	1960	110
6,5	74,4	2220	985	179	99	733	603	2525	170

Tab. 4 (Fortsetzung)

N Eiweiß [γ]	PO <sub>4</sub> '' ges.	PO <sub>4</sub> '' TES	PO <sub>4</sub> '' Lip.	PO <sub>4</sub> '' Nucl.s.	DNS	RNS		N TES
	Eiweiß-N	Eiweiß-N	Eiweiß-N	Eiweiß-N	Eiweiß-N	Eiweiß-N	RNS	Eiweiß-N
	[γ/mg]	[γ/mg]	[γ/mg]	[γ/mg]	[γ/mg]	[γ/mg]	DNS	[γ/mg]
30	594	102	68	509	426	1870	4,4	102
74	838	81	67	750	486	2910	5,9	179
200	986	67	67	846	444	3460	7,8	132
434	880	73	67	796	395	3160	8,0	115
912	754	87	63	595	356	2150	6,05	121
1531	643	117	65	478	394	1650	4,2	111

Tab. 4 gibt eine Zusammenstellung der Analysenwerte aus einem typischen Versuch mit großem Inoculum und einmaligem Entwicklungsablauf. Wie die sehr geringe Zunahme der Extinktion im ersten Intervall zeigt, hat noch keine wesentliche Zellvermehrung stattgefunden. Der geringe Anstieg dürfte weitgehend auf der Vergrößerung der heranwachsenden Zellen beruhen. Dagegen erfolgt in dieser Phase bereits eine starke NS-Vermehrung, wobei besonders die RNS rasch ansteigt, so daß das RNS/DNS Verhältnis beinahe schon den Maximalwert erreicht. Die Verdreifachung der DNS-Menge ohne entsprechende Vermehrung der Zellzahl stimmt mit der Beobachtung überein, daß die Bakterien während



der Vermehrungsphase meist mehrere Nucleoide besitzen. Mit dem Übergang in die stationäre Phase, etwa in der 4. Stunde, sinkt der RNS-Gehalt, bezogen auf Eiweiß-N bzw. auf DNS, wieder stark ab.

Bei den zahlenmäßig kleinen Fraktionen treten keine sehr charakteristischen Veränderungen im Entwicklungsablauf ein. So bleibt das Lipoid-Phosphat, bezogen auf den Eiweißgehalt praktisch gleich, das TES-lösliche Phosphat, wiederum auf Eiweiß bezogen, weist während der log-Phase eine leichte Verminderung, der TES-lösliche N dagegen eine Vermehrung auf. Eine statistische Sicherung dieses Effektes ist aber wegen der starken Streuung dieser kleinen Werte sehr schwierig. Bei unseren späteren Betrachtungen kommt diesen Fraktionen keine besondere Bedeutung zu. Sie wurden hier nur angeführt, um einen vollständigen Überblick über die Stoffverteilung in den einzelnen Fraktionen zu geben und eine Bilanz zu ermöglichen.

Bei zahlreichen Wiederholungen der Versuche traten für die maximalen NS-Werte größere Schwankungen auf, weil die betreffenden Zustände so schnell durchlaufen wurden, daß die Probeentnahme nicht immer das wirkliche Maximum traf. Die Differenz zwischen log-Phase und früher stationärer Phase ist aber zweifellos reell, wie die Zusammenstellung der Mittelwerte und der zugehörigen Streuungen in Tab. 5 zeigt.

Tabelle 5. Mittelwerte für den Nucleinsäuregehalt von *P. vulgaris* während der log- und der stationären Phase.  $n = 12$

	RNS/DNS	$\sigma$ RNS/DNS	RNS $\left[ \frac{\gamma}{\text{mg}} \right]$ Eiweiß-N	$\sigma$ RNS $\left[ \frac{\gamma}{\text{mg}} \right]$ Eiweiß-N	DNS $\left[ \frac{\gamma}{\text{mg}} \right]$ Eiweiß-N	$\sigma$ DNS $\left[ \frac{\gamma}{\text{mg}} \right]$ Eiweiß-N
Maximal- werte	7,28	$\pm 1,01$	312	$\pm 34$	46,2	$\pm 10,6$
stat. Phase	3,93	$\pm 0,30$	180	$\pm 34$	43,7	$\pm 10,5$

Eine ausführliche Darstellung der Veränderungen im NS- und Eiweißgehalt sowie in der Atmungsintensität während der Entwicklung ergaben die Versuche mit wiederholter Überimpfung, deren Ergebnisse in den Abb. 2—5 enthalten sind. Die erste Impfung erfolgte mit der Bakterienmasse aus 50 ml einer 48 Std alten, also bereits ruhenden Kultur. Unmittelbar nach dem Einimpfen wurden je 3 ml in 6 Atmungströge der WARBURG-Apparatur übertragen. Während aus der großen Suspensionsmenge in 50 min Abständen Proben (zunächst 200 ml, später 50 ml) entnommen und wie oben beschrieben aufgearbeitet wurden, konnte an den Manometern der WARBURG-Apparatur der Sauerstoffverbrauch abgelesen werden. Um sich zu vergewissern, daß die Entwicklung im großen Kolben und in den Atmungströgen synchron verlief, wurde gleichzeitig

mit jeder Probeentnahme ein Atmungsstrog geöffnet, die Suspension entnommen und die Extinktion bestimmt. Es zeigte sich, daß die so erhaltenen Zuwachskurven völlig gleichartig waren. Damit konnte der gemessene Sauerstoffverbrauch mit den N- und NS-Zuwachswerten in Beziehung gesetzt werden.

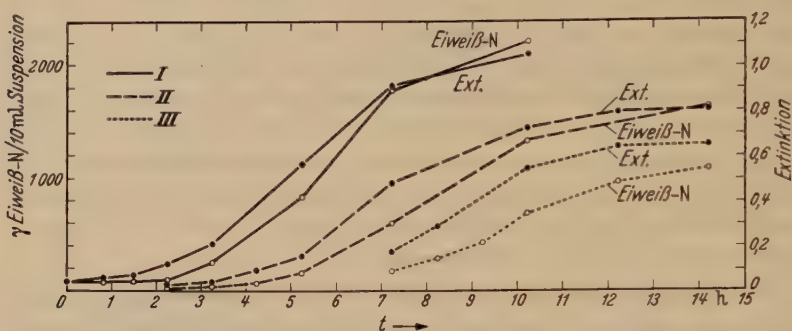


Abb. 2. Zunahme der Extinktion und des Eiweiß-N/10 ml Suspension bei wiederholter Überimpfung von *Proteus vulgaris*

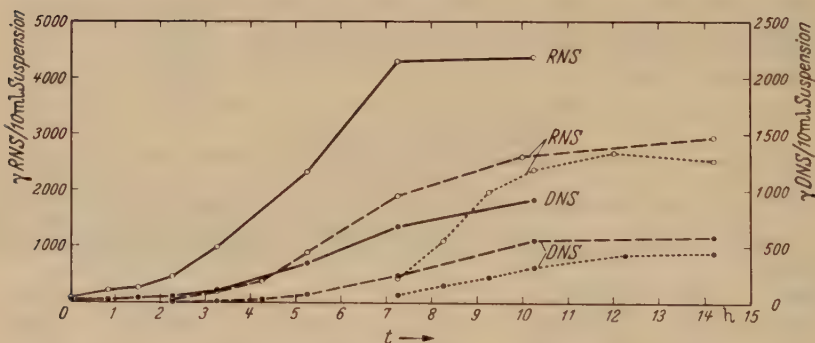


Abb. 3. Zunahme von RNS und DNS, jeweils auf 10 ml Suspension bezogen, bei wiederholter Überimpfung von *P. vulgaris*

Die erste Überimpfung auf frische Nährlösung erfolgte gleichzeitig mit der 3. Probeentnahme, also in der frühen log-Phase, die 2. mit der 6. Entnahme, am Übergang zur stationären Phase. Die Zuwachskurven sind in den Abb. 2 und 3 enthalten. Für die Verminderung des Gesamtzuwachses bei den Abimpfungen II und III kann keine Ursache angegeben werden. Der Effekt trat aber bei beiden in dieser Art durchgeführten Parallelproben auf.

Von besonderem Interesse sind die in Abb. 4a—c dargestellten Quotienten. Bei der Probe I und III ergaben sich für das Verhältnis RNS/Eiweiß-N ähnliche Werte wie bei den oben beschriebenen Ansätzen,



während es bei der Probe II zu einem weiteren Anstieg kommt. Dieses in 3 Entnahmen erfaßte Maximum dürfte den Zustand in Teilung begriffener *Proteus*-Zellen am zutreffendsten charakterisieren. Auch der DNS-Gehalt steigt bei der Probe II weiter an und erreicht auch bei III das gleichhohe Maximum. Dieser Anstieg des DNS/Eiweiß-N-Quotienten ist teil-

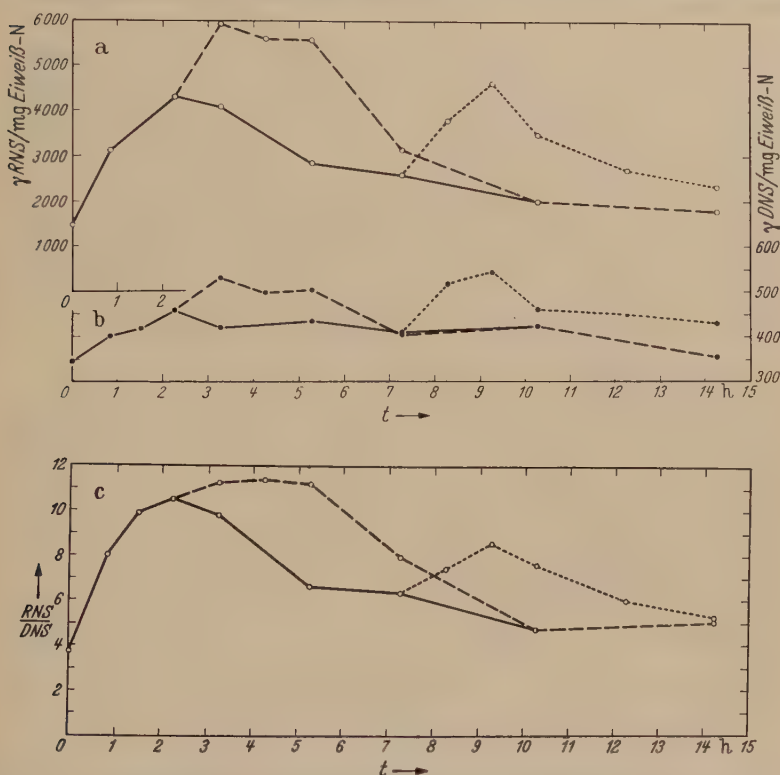


Abb. 4 a—c. Abhängigkeit der Quotienten RNS/Eiweiß-N, DNS/Eiweiß-N [ $\gamma$ /mg] und RNS/DNS von der Entwicklung bei wiederholter Überimpfung von *P. vulgaris*

weise dadurch bedingt, daß die Zellgröße bei lange anhaltender Teilungstätigkeit abnimmt. Es war in unseren Kulturen immer wieder zu beobachten, daß bei Einimpfung aus längere Zeit (etwa 24 Std) ruhenden Kulturen die Zellgröße stark zunahm, während bei Überimpfung aus der frühen stationären Phase wesentlich kleinere Bakterien entstanden. Da diese Größenschwankungen wohl vorwiegend das Plasma, d. h. Eiweiß und RNS, und nicht die Kernsubstanz (DNS) betreffen, folgt daraus die Erhöhung des Quotienten DNS/Eiweiß-N, bzw. die Erniedrigung des RNS/DNS-Verhältnisses, wie es Abb. 4c für Probe III zeigt. Die Maximalwerte für RNS/DNS erbrachte wiederum die Probe II. Sie liegen in

der lag-, bzw. frühen log-Phase, in der die Bakterien die größten Zellgrößen aufweisen.

Den absoluten Sauerstoffverbrauch von je 10 ml Suspension zeigt Abb. 5a. Nach dem steilen Anstieg mit zunehmender Vermehrung erreicht er ein kurze Zeit konstantes Niveau und fällt mit dem Aufhören der log-Phase scharf ab. Bezieht man den Sauerstoffverbrauch auf Eiweiß-N,

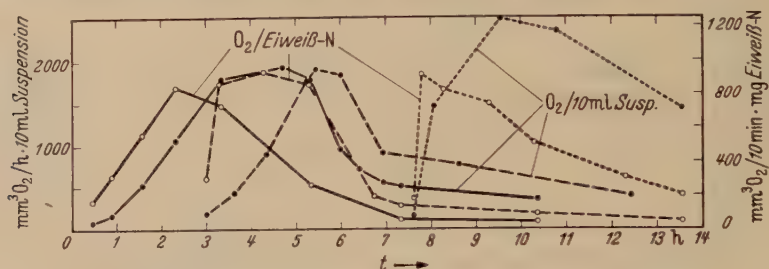


Abb. 5a. Atmungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Entwicklung; bezogen auf je 10 ml Suspension bzw. auf 1 mg Eiweiß-N

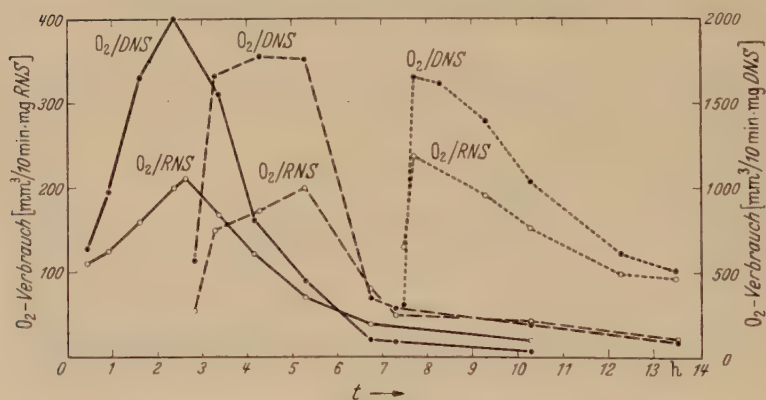


Abb. 5b. Wie Abb. 5a, aber bezogen auf 1 mg RNS bzw. DNS

so verschiebt sich das Maximum auf die frühe log-Phase. Die Kurven zeigen eine klare Parallelität zu denen für RNS/Eiweiß-N und fallen genau zum gleichen Zeitpunkt wie diese ab. Darin zeigt sich erneut der enge Zusammenhang von RNS-Gehalt und Stoffwechselaktivität.

Allerdings handelt es sich nicht um eine direkte Beziehung zwischen den beiden Faktoren in dem Sinne, daß die Atmungsintensität im gleichen Umfang ansteigt wie der RNS-Gehalt. Der Quotient Sauerstoffverbrauch/RNS müßte dann weitgehend konstant bleiben. Dies ist jedoch auch nicht annähernd der Fall, wie Abb. 5b zeigt. Die gleiche Abbildung enthält auch die Kurven für den Sauerstoffverbrauch je mg DNS. Sie stimmen in ihrem Verlauf weitgehend mit denen überein, die man



erhält, wenn man den Sauerstoffverbrauch auf die Zellzahl bezieht (Berechnung der Zellzahl aus der Extinktion an Hand einer Eichkurve, die durch Verdünnen von dichten Suspensionen gewonnen wurde). Dies entspricht ganz der Erwartung, weil ja die Kernmasse maximal nur um einen Faktor von 2, im Mittel der nicht synchron sich teilenden Bakterien um einen solchen von 1,5 schwanken kann und somit der Zahl der reproduktiven Einheiten parallel gehen muß. Da bei den später zu besprechenden Organismen eine Keimzählung im strengen Sinne nicht möglich ist, wurde einheitlich an Stelle der Zellzahl der DNS-Gehalt als Bezugsgröße benützt. Die Lage der Maxima der entsprechenden Kurven in Abb. 5b zeigt, daß auch auf das einzelne Bakterium bezogen der Sauerstoffverbrauch am Ende der lag-Phase und beim Übergang in die log-Phase sein Maximum erreicht. Noch während rascher Vermehrung sinkt er bereits beträchtlich ab. Dieser Abfall ist aber lediglich durch die Erschöpfung des Substrates, nicht durch einen Abbau der Fermentsysteme bedingt, wie der rasche Anstieg nach Zugabe neuen Substrates (Überimpfung) zeigt.

## 2. Versuche mit der L-Phase von *Proteus vulgaris*

In einer ersten Versuchsserie wurden jeweils 10 Steilbrustflaschen (300 ml Nährlösung) mit einem bewachsenen Agarstück beimpft und ohne Schütteln bei 37° C bebrütet. Nach Auftreten einer kräftigen Trübung nach etwa 24 Std wurden die beiden ersten Kolben abzentrifugiert und ebenso wie die *Proteus*-Kulturen aufgearbeitet. Allerdings unterblieb in diesen Fällen das Auswaschen, so daß erst mit dem TES-Extrakt die Nährbodenreste entfernt wurden. Weitere Proben wurden dann in Abständen von ein bis mehreren Tagen verarbeitet, wobei wegen des stärkeren Zuwachses je 1 Kolben genügte.

Nach dem Abzentrifugieren wurde jeweils 1 ml der in 10 ml suspendierten Organismen zur Bestimmung der Sauerstoffaufnahme in einen Atmungsstrog gegeben und nach einigen Minuten aus dem seitlichen Kipper normale Nährlösung als Substrat zugegeben. Die nach etwa einer Stunde erreichte konstante Atmung ist bei den folgenden Darstellungen verwendet.

Vor dem Zentrifugieren wurden die Suspensionen auf ihre Bakterienfreiheit im Mikroskop untersucht. Im Phasenkontrast sind die Organismen ohne Färbung sehr gut erkennbar. Bei jungen Kulturen handelt es sich vorwiegend um mehr oder weniger kontrastreiche Blasen, die zu Klumpen vereinigt sind. Ein Teil der Blasen ist stark vacuolisiert und erscheint weitgehend leer. Nur am Rand sind kontrastreichere Körnchen erkennbar. Je nach der mechanischen Beanspruchung beim Umschütteln lösen sich die Flocken zu kleineren Verbänden oder auch Einzelorganismen auf, doch ist praktisch keine auch nur annähernd homogene Verteilung möglich. Damit werden Keimzählungen nach der üblichen

Verdünnungsmethode höchst problematisch. Mit fortschreitendem Alter vergrößern sich die Blasen sehr stark und vacuolisieren immer mehr. Die kontrastreichen Teilchen werden kleiner und es ist nicht mehr zu entscheiden, was in diesem „Granulat“ die vermehrungsfähigen Einheiten sind, die zweifellos in großer Zahl vorhanden sind, da nach Ausstreichen auf Agarnährböden

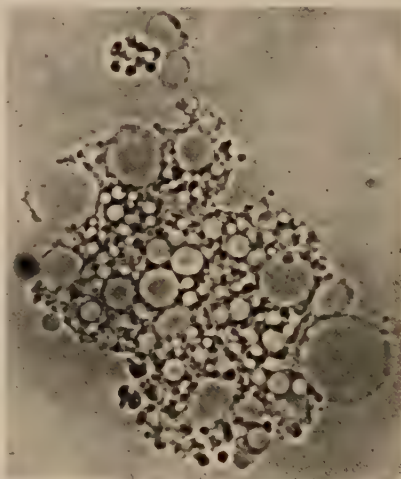
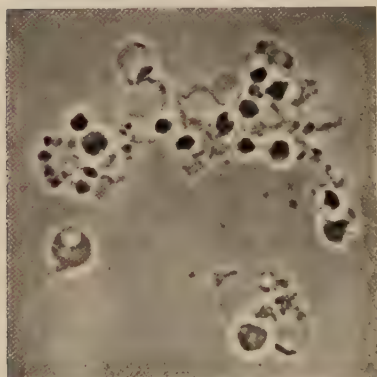


Abb. 6a und b. Einzelorganismen und traubige Verbände aus 2d alten Flüssigkeitskulturen von *Proteus*-L-Formen. Phasenkontrastaufnahme (Gesamtvergrößerung 800 $\times$ ).

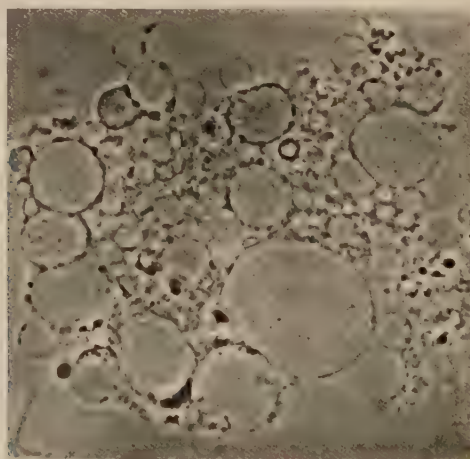


Abb. 7. Typische Flocke aus einer 4d alten Flüssigkeitskultur von *Proteus*-L-Formen (Gesamtvergrößerung 800 $\times$ )

noch massenhaft Kolonien gebildet werden. Abb. 6a und b zeigen typische Flocken aus jüngeren, noch wachsenden, Abb. 7 aus einer etwas älteren, bereits stationären Kultur. Bei noch älteren Kulturen ändert sich das mikroskopische Bild nicht mehr wesentlich.



Tab. 6 gibt einen Einblick in die stofflichen Veränderungen alternierender Kulturen. Schon nach 3 Tagen ist der Hauptzuwachs an DNS und Eiweiß abgeschlossen. Beide werden im Laufe der nächsten Wochen nur noch auf das Doppelte vermehrt. Der RNS-Gehalt sinkt jedoch schon von der ersten Probe (24 Std) an kontinuierlich ab. Es wird also während des weiteren Wachstums eines Teiles der Keime RNS abgebaut und an die Nährlösung abgegeben, so daß sie nicht mehr zentrifugierbar ist. Demgegenüber bleiben DNS und Eiweiß in geformter und damit zentrifugierbarer Form erhalten.

Tabelle 6. *Übersicht über die Veränderung des Nucleinsäuregehaltes und der Atmungsintensität der L-Phase bei längerer Kulturdauer*

Kultur- dauer in d	Eiweiß-N γ/10 ml	RNS γ/10 mg	DNS γ/10 mg	RNS	DNS	RNS DNS	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>
				Eiweiß-N γ/mg	Eiweiß-N γ/mg		10 min · mg Eiweiß-N	10 min · mg RNS	10 min · mg DNS
1	280	740	140	264	500	5,28	44	15	90
3	340	540	185	1590	544	2,92	52	33	95
4	360	470	200	1305	555	2,35	60	46	103
6	390	380	215	980	532	1,77	66	68	115
13	490	280	240	570	490	1,16	55	97	112
24	620	180	255	290	412	0,73	23	82	58
44	660	160	260	243	395	0,67	4	17	12

Entsprechend diesem gegenläufigen Verhalten der Absolutwerte zeigen auch die Werte für die Quotienten einen typischen Verlauf. RNS/DNS und RNS/Eiweiß-N nehmen rasch ab und erreichen extrem niedere Werte, wie sie bei Bakterien selbst in vielen Wochen alten Kulturen nicht gemessen werden können. Das RNS/DNS-Verhältnis liegt bei den alten Suspensionen sogar invers. Bei allen untersuchten Proben wurden Werte unter 1,0 gefunden. Dies stimmt mit den Befunden von VENDRELY u. TULASNE (1953) überein, die ebenfalls alte L-Phasenkulturen verwendeten. Unsere Untersuchungen zeigen aber, daß es sich dabei nicht um eine typische Eigenschaft der L-Phase handelt, denn im vegetativen Zustand liegt das Verhältnis bei 5, also in einer Größenordnung, die auch bei den Bakterien üblich ist, wenn auch bei *Proteus* noch etwa doppelt so hohe Werte erreicht werden. Ob die niederen Werte für RNS/Eiweiß und RNS/DNS bei alten Kulturen tatsächlich für die Ruheformen der L-Phasen repräsentativ sind, ist sehr fraglich. Keimzählungen ergaben, daß schon die Zahl der koloniebildenden Elemente im Laufe dieser Zeit mindestens um eine Zehnerpotenz absinkt. Wie oben erwähnt, hängen die Einzelorganismen in der Regel in traubigen Verbänden zusammen, so daß jede ausgezählte Kolonie ein Vielfaches an vermehrungsfähigen Einheiten anzeigt. Wenn nun in diesen Flocken ein Großteil der Einzelkeime

abstirbt, so wird der überlebende Rest immer noch zu einer Kolonie führen und den Rückgang der echten Keimzahl verschleiern. So ist es gut möglich, daß in Kulturen mit wenig verminderter „Keimzahl“ nur noch ein geringer Bruchteil der Einzelorganismen lebensfähig ist und bei der Analyse der stofflichen Zusammensetzung dementsprechend im wesentlichen nur die nicht in Lösung gegangenen Reste der abgestorbenen Einheiten erfaßt werden.

Eine gewisse Entscheidung dieser Frage ist durch die Messung der Atmungsintensität möglich. Gibt man zu ruhenden Organismen neues Substrat, so wird der in kurzer Zeit erreichte Sauerstoffverbrauch anzeigen, inwieweit die Fermentsysteme der Atmung noch in aktiver Form vorhanden sind. Wie Tab. 6 zeigt, bleibt die Atmungsintensität auf Eiweiß bezogen über etwa 14d praktisch gleich groß, das heißt, es tritt in dieser Zeit kein Abbau der Fermente ein. Dies gilt auch für die Werte  $O_2$ -Verbrauch/DNS, die man annähernd auch als konstante Vielfache der Werte für  $O_2$ -Verbrauch/Zelle auffassen kann. Hier ergibt sich sogar ein Anstieg von etwa 20% in den ersten 8d. Daraus geht hervor, daß der starke Abfall des RNS-Gehaltes kein Zeichen einer Zerstörung von Organismen ist, denn der Hauptabfall liegt gerade in diesen ersten 14d, in denen die Atmung noch ansteigt. Dementsprechend steigt der Sauerstoffverbrauch auf RNS bezogen in den ersten 14d stark an. Der RNS-Abbau und das Absinken des RNS/DNS-Verhältnisses gegen 1,0 stellt also einen normalen Vorgang bei der L-Phase dar und ist kein Zeichen des Verfalls.

Ob auch das weitere Absinken des NS-Gehaltes noch als normal angesehen werden kann, bleibt fraglich, denn die Atmung ist bei diesen alten Suspensionen erheblich reduziert. Dies muß natürlich noch kein Beweis für das Absterben sein, denn man kann sich vorstellen, das die Ruheformen der L-Phase ihre Fermentsysteme weitgehend abbauen und erst in einer längeren lag-Phase wieder regenerieren, so daß in der hier gewählten kurzen Beobachtungszeit nur eine geringe Atmung gemessen wird. Tatsächlich steigt bei längerer Beobachtung die Atmung langsam an, doch ist es unmöglich zu entscheiden, ob alle Keime ihren Umsatz allmählich steigern oder ob einige wenige sich unter hoher Atmungsintensität rasch vermehren und dadurch zu einem gesteigerten Gesamtsauerstoffverbrauch Anlaß geben. Die Frage nach dem NS-Gehalt ruhender L-Phasen muß also zunächst unbeantwortet bleiben. Es kann nur mit Sicherheit angegeben werden, daß alte Suspensionen einen sehr niederen Quotienten für RNS/Eiweiß-N und RNS/DNS aufweisen, ohne über die Zusammensetzung an lebenden und abgestorbenen Organismen eine Aussage machen zu können.

Wichtig erschien es uns, den Übergang von ruhenden Kulturen in die Wachstums- und Vermehrungsphase analytisch zu erfassen. Dazu wurden wiederum große Einimpfmengen wie bei *Proteus* verwendet, so daß



bereits in kurzer Zeit eine meßbare Substanzzunahme eintrat. Die Ergebnisse eines derartigen Versuchsansatzes zeigt Tab. 7. Aus der Darstellung der Absolutwerte/10 ml Suspension geht wiederum hervor, daß die RNS schon unmittelbar nach Abschluß der log-Phase teilweise abgebaut und ausgeschieden wird, während der Eiweiß-N noch leicht weiter ansteigt und die DNS konstant bleibt.

Tabelle. 7. Übersicht über die Veränderung des Nucleinsäuregehaltes während der Entwicklung bei Verwendung eines großen Inoculums

Kultur- dauer in h	Extinktion	Eiweiß-N γ/10 ml	RNS γ/10 ml	DNS γ/10 ml	RNS	DNS	RNS DNS
					Eiweiß-N γ/mg	Eiweiß-N γ/mg	
0	0,045	30	18	12	600	400	1,5
13	0,06	150	300	75	2000	500	4,0
15,5	0,125	220	530	110	2420	500	4,8
17,5	0,210	265	770	160	2900	603	4,82
19,5	0,280	365	1000	240	2740	658	4,17
21,5	0,35	530	1300	310	2500	585	4,2
23,5	0,365	580	1110	320	1920	552	3,5
25,5	0,375	620	1040	310	1680	500	3,35
39	0,440	830	710	290	855	350	2,45
46	0,460	880	690	280	782	318	2,45

Der Verlauf der Werte für RNS/Eiweiß-N zeigt deutlich das Vorausschießen der RNS-Synthese vor der Eiweißsynthese. Auch die Werte für DNS/Eiweiß-N steigen leicht an und erreichen ein flaches Maximum in der Mitte der log-Phase. Das RNS/DNS-Verhältnis wird bereits in der lag-Phase beinahe auf seinen Maximalwert erhöht, der in der frühen log-Phase erreicht ist. Eine Zusammenstellung der maximalen RNS/DNS-Werte und der NS/Eiweiß-N-Werte für die log- und frühe stationäre Phase aus 8 Ansätzen mit Einimpfungen von 2—8 d altem Material enthält Tab. 8.

Tabelle 8. Mittelwerte verschiedener Quotienten zur Charakterisierung des Nucleinsäuregehaltes von L-Phasen. Jeweils aus der log-Phase (Maximalwerte) und der frühen stationären Phase entnommen.

	RNS/DNS	RNS/DNS $\sigma$	RNS Eiweiß-N $\left[ \frac{\gamma}{mg} \right]$	RNS Eiweiß-N $\left[ \frac{\gamma}{mg} \right]$	DNS Eiweiß-N $\left[ \frac{\gamma}{mg} \right]$	DNS Eiweiß-N $\left[ \frac{\gamma}{mg} \right]$
Maximal- werte	5,40	$\pm 0,75$	2300	$\pm 615$	630	$\pm 108$
stat. Phase	1,70	$\pm 0,30$	870	$\pm 130$	490	$\pm 70$

Wie bei den Versuchen mit *Proteus vulgaris* wurde auch bei der L-Phase bei 2 Versuchen aus einer heranwachsenden Suspension 2 mal auf frische Nährlösung überimpft, und zwar ganz entsprechend wie früher in

der frühen log- und nach Erreichen der stationären Phase. Damit ist die Gewähr für eine lückenlose Erfassung und möglichst vollständige Beschreibung des Entwicklungsablaufes in Bezug auf die hier besprochenen Faktoren gegeben. Abb. 8a—g enthalten das Ergebnis. Die ausführlichen Kurvendarstellungen erübrigen eine detaillierte Besprechung. Es zeigten sich wieder die gleichen charakteristischen Veränderungen wie in

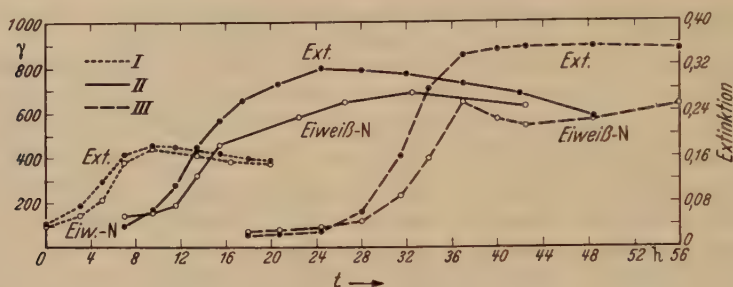


Abb. 8 a. Zuwachs von L-Formen bei wiederholter Überimpfung. Extinktion und Eiweiß-N/10 ml

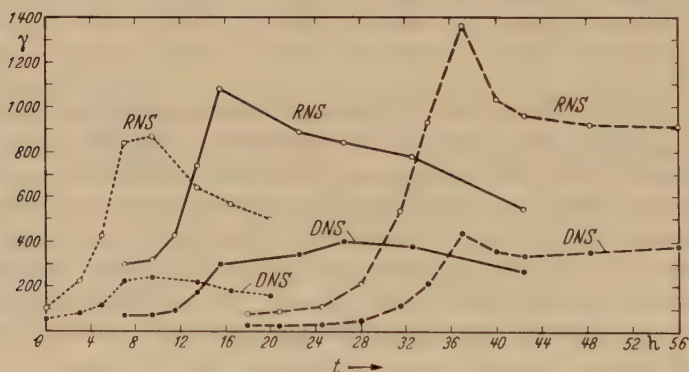


Abb. 8 b. RNS und DNS-Zunahme je 10 ml.

den vorher geschilderten Ansätzen. Auch durch Verlängerung der log-Phase durch frühzeitige Überimpfung wurde keine Steigerung der Quotienten für NS/Eiweiß oder RNS/DNS erreicht. Hingewiesen sei noch besonders auf die Darstellung der pH-Änderung im Laufe des Wachstums, die auch schon bei den früheren Versuchen aufgefallen war. Das glucosehaltige Substrat wird zunächst wie bei *Proteus*-Kulturen angesäuert, schlägt aber nach Abschluß der Vermehrungsphase wieder ins Alkalische um, was bei *Proteus* nicht beobachtet werden konnte.

Wie bei den entsprechenden Versuchen mit *Proteus* wurde auch hier der Sauerstoffverbrauch in gleicher Weise gemessen. Abb. 8f zeigt den absoluten Sauerstoffverbrauch je 3 ml Suspension und Stunde, der

gegen Ende der log-Phase sein Maximum erreicht, und den Sauerstoffverbrauch bezogen auf die jeweilige Eiweißmenge, dessen Maximum schon wesentlich früher liegt. Der Abfall der Atmungsintensität ist in diesen Ansätzen ausschließlich durch Substraterschöpfung bedingt. Diese

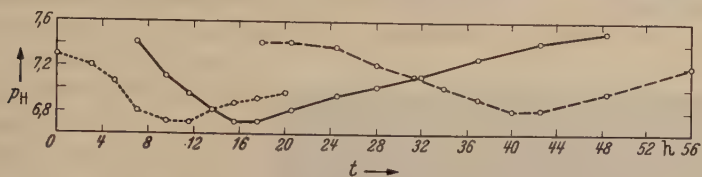


Abb. 8c. pH-Änderungen in der Nährlösung, parallel zu den in Abb. 8a und b dargestellten Zuwachswerten

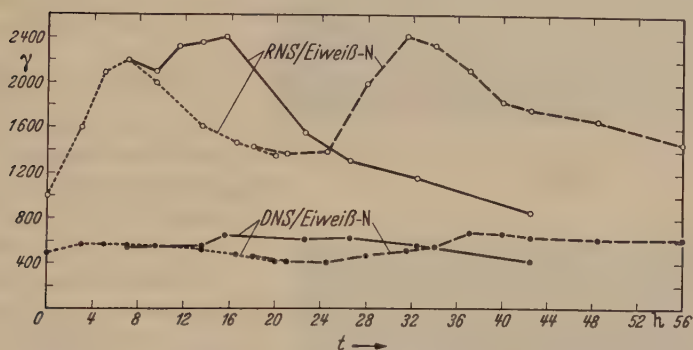


Abb. 8d. Darstellung der Veränderung der Quotienten RNS/Eiweiß-N und DNS/Eiweiß-N [ $\gamma/\text{mg}$ ] bei wiederholter Überimpfung

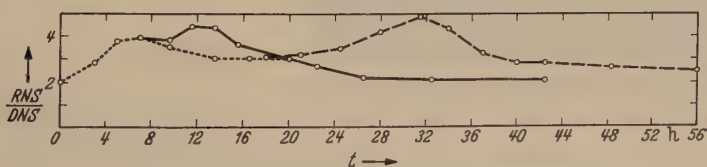


Abb. 8e. Veränderungen des RNS/DNS-Verhältnisses

Kurven dürfen mit den Werten der Tab. 6 nicht verglichen werden, da dort immer frisches Substrat zugegeben und die Atmung nur über 2 Std gemessen wurde. Der N-Gehalt der Suspension lag dabei um ein Vielfaches (etwa 10fach) höher. Unter diesen Bedingungen erfolgt praktisch kein Wachstum, da in so dichten Suspensionen offenbar gegenseitige Hemmung durch Stoffwechselprodukte (im einfachsten Falle ist schon an das rasche Absinken des pH-Wertes zu denken) eintritt. Die Atmungsintensität ist unter diesen Umständen erheblich geringer als bei wachsenden Kulturen. Diese Beobachtung gilt auch für Bakterien.



Bezieht man die Atmung auf RNS, so ergibt sich für die L-Phase ein völlig anderes Bild als für *Proteus* (Abb. 8g). Der waagerechte Verlauf der Kurven zeigt an, daß in diesem Falle die Atmungsintensität dem RNS-Gehalt lange direkt proportional bleibt. Auch die Kurven für  $O_2$ -Verbrauch/DNS zeigen gegenüber *Proteus* einen anderen Charakter. Der Wechsel der Atmungsintensität je vermehrfähige Einheit ver-

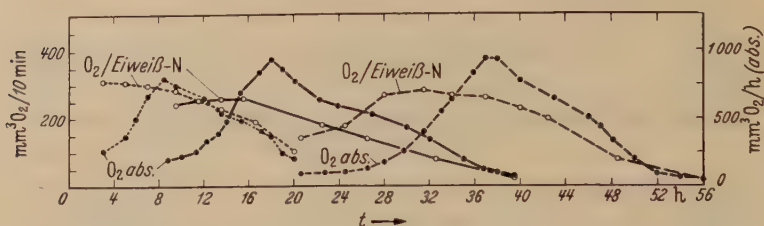


Abb. 8f. Abhängigkeit der Atmungsintensität, bezogen auf 10 ml Suspension bzw. 1 mg Eiweiß-N, von der Entwicklung

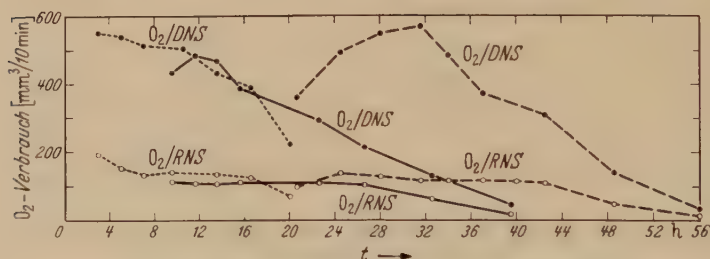


Abb. 8g. Wie Abb. 8f, aber bezogen auf 1 mg DNS bzw. RNS

läuft demnach wesentlich ausgeglichener und allmählicher. Das Maximum liegt wiederum in der frühen log-Phase.

Gegenüber den von *Proteus* erreichten Atmungsgeschwindigkeiten liegen die der L-Phase erheblich niedriger. Dies entspricht auch der wesentlich langsameren Entwicklung. Besonders die lag-Phase ist bei Verwendung von Material aus der stationären Phase, wie z. B. bei Probe III oder dem in Tab. 6 dargestellten Ansatz, deutlich ausgeprägt. In dieser Zeit erreicht der oxydative Stoffwechsel ein Maximum.

### 3. Versuche mit PPLO

Ähnlich wie bei der L-Phase tritt auch in Flüssigkeitskulturen von PPLO etwa 24 Std nach Beimpfung mit einem bewachsenen Agarstück eine homogene Trübung der Nährlösung auf. Die mikroskopische Untersuchung im Phasenkontrast zeigt relativ große flockige Verbände, die wohl als kleine Kolonien aufgefaßt werden müssen. Praktisch ist nur am

Rand eine Gliederung in kleine kokkenartige Untereinheiten zu erkennen (Abb. 9a). Nur selten sind dazwischen auch kleinere Verbände oder Einzelorganismen zu finden. Etwa 24 Std später, besonders wenn in der Zwischenzeit wiederholt umgeschüttelt wird, lösen sich diese Flocken in kleinere Gruppen auf, wie Abb. 9b zeigt. Eine gute photographische Darstellung ist sehr erschwert, weil diese kleinen, vielfach nur aus 2—4 Einzelorganismen bestehenden Verbände starke BROWNSche Molekularbewegung aufweisen. Der Vergleich der beiden Abbildungen zeigt aber eindeutig den wesentlichen Unterschied. Ähnlich verläuft die Entwicklung auch in Schüttelkulturen, wenn auch hier auf Grund der stärkeren mechanischen Beanspruchung die Auflösung der Flocken rascher und gründlicher vor sich geht. Eine wirklich homogene Verteilung der Organismen wird aber auch dabei nicht erreicht, weil die Vermehrung nicht wie bei den Bakterien durch eine Zweiteilung, sondern durch multipolare Knospung (KANDLER u. KANDLER, 1954) erfolgt.

Dabei entstehen zunächst traubige Verbände, aus denen sich die Einzelorganismen erst allmählich individualisieren und nach Ausbildung einer stabileren Grenzschicht bzw. Membran ablösen.

Für die Bestimmung der Keimzahl nach dem Verdünnungsverfahren bestehen bei den PLO die gleichen Schwierigkeiten, wie sie bei der Besprechung der L-Phase hervorgehoben wurden. Die Tatsache, daß der Zerteilungsgrad der Flocken sowohl vom Alter, als auch von der mechanischen Beanspruchung abhängt, mag der Grund für die Befunde GERBERS (1955) sein, daß die Keimzahl stufenweise ansteigen kann. In eigenen Versuchen fanden wir zwar sehr starke Schwankungen in der Keimzahl wachsender Kulturen, aber kein Anzeichen für ein deutliches Ansteigen in Stufen. Im Mittel ergab sich ein weitgehend kontinuierlicher

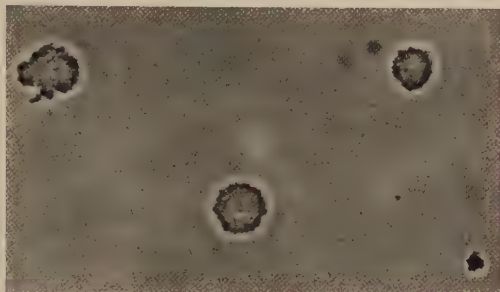


Abb. 9a. Flockige Verbände von PLO aus 24stündigen Flüssigkeitskulturen. Phasenkontrastaufnahme (Gesamtvergrößerung 800 ×)



Abb. 9b. Phasenkontrastaufnahme aus der gleichen Kultur wie Abb. 9, jedoch 24 Std später. Vergrößerung 800 ×

Anstieg, wie er auch auf Grund der Extinktionsmessung und der Absolutzunahmen an Eiweiß und NS in Erscheinung tritt.

Bei mehreren Versuchsserien über längere Zeit wurden parallel zu den NS-Bestimmungen auch elektronenmikroskopische Untersuchungen ausgeführt<sup>1</sup>. Die Präparation erfolgte in einfacher Weise durch Auftrocknen einer einmal gewaschenen Suspension auf die Trägerfolien.

Tabelle 9. *Mittelwerte der Durchmesser der kontrastreichen Teilchen aus verschiedenen alten PPLO-Flüssigkeitskulturen.*

*Nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen ausgemessen*

Zeit	mittlerer Durchmesser [m $\mu$ ]	$\sigma$ [m $\mu$ ]	n
21 h	0,70	$\pm 0,035$	30
36 h	0,53	$\pm 0,031$	30
4 d	0,44	$\pm 0,028$	30
5 d	0,35	$\pm 0,013$	30
12 d	0,34	$\pm 0,024$	30
26 d	0,32	$\pm 0,018$	30

Meist wurden die Objekte mit Titandioxyd bedampft. Es ergaben sich die gleichen Bilder, wie sie bereits früher veröffentlicht (KANDLER u. Mitarb., 1954) worden sind. Die Ausmessung der kontrastreichen Teilchen aus einer derartigen Entwicklungsreihe ergab die in Tab. 9 zusammengestellten Zahlen. Mit zunehmendem Alter und Schwund der RNS zeigt sich eine deutliche Abnahme des Durchmessers.

Tabelle 10. *Übersicht über Nucleinsäuregehalt und Atmungsintensität von PPLO bei verschieden langer Kulturdauer*

Kultur- dauer	Eiweiß-N $\gamma/10$ ml	RNS $\gamma/10$ ml	DNS $\gamma/10$ ml	RNS Eiweiß-N $\gamma/\text{mg}$	DNS Eiweiß-N $\gamma/\text{mg}$	RNS DNS	$\frac{\text{mm}^3 \text{O}_2}{10 \text{ min} \cdot \text{mg}}$ Eiweiß-N	$\frac{\text{mm}^3 \text{O}_2}{10 \text{ min} \cdot \text{mg}}$ RNS	$\frac{\text{mm}^3 \text{O}_2}{10 \text{ min} \cdot \text{mg}}$ DNS
20 h	51	92	25	1800	490	3,68	22	14	45
36 h	120	185	48	1540	400	3,85	21	13	50
4 d	184	122	38	660	207	3,2	13	19	61
5 d	178	98	35	550	197	2,8	11	20	54
12 d	160	61	28	380	175	2,18	4	13	26
26 d	138	46	24	333	174	1,91	1	2	3

Die Aufarbeitung von Kulturen mit geringen Einimpfmengen in größeren Zeitabständen erbrachte die in Tab. 10 dargestellten Verhältnisse. Wie bei der L-Phase sinkt der absolute RNS-Gehalt schon zu einer Zeit, in der noch eine deutliche Eiweißzunahme erfolgt, stark ab.

<sup>1</sup> Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden am II. Physikalischen Institut der Universität München gemacht. Herrn Dr. O. HUBER sind wir für seine Mitarbeit sehr zu Dank verpflichtet.



Der DNS-Gehalt bleibt praktisch über lange Zeit konstant. Der Quotient RNS/DNS liegt bei jungen Kulturen zwischen 3 und 3,8, bei älteren zwischen 1,5 und 2,0. Selbst bei sehr alten Kulturen sinkt er nicht wie bei der L-Phase unter 1,0 ab.

Die Werte für die Atmungsintensität (auf gleiche Weise gewonnen wie bei den entsprechenden Versuchen mit der L-Phase) sinken rascher ab als bei der L-Phase. Auf DNS bezogen bleibt die Atmung über 5 Tage konstant, also wiederum in dem Zeitraum, in dem der RNS-Gehalt stark absinkt. Daraus kann geschlossen werden, daß der Abbau der RNS wie bei den L-Phasen ein normaler Vorgang ist und kein Anzeichen der Zerstörung von Organismen darstellt.

Tabelle 11. *Übersicht über den Nucleinsäuregehalt von PPLO in Abhängigkeit von der Entwicklung bei Verwendung eines großen Inoculums*

Kultur- dauer in h	Extinktion	Eiweiß-N γ/10 ml	RNS γ/10 ml	DNS γ/10 ml	$\frac{\text{RNS}}{\text{Eiweiß-N}}$ γ/mg	$\frac{\text{DNS}}{\text{Eiweiß-N}}$ γ/mg	$\frac{\text{RNS}}{\text{DNS}}$
0	0,018	24	14	8	582	333	1,75
13,5	0,035	46	95	32	2006	692	2,97
16	0,038	55	110	38	2000	692	2,9
18	0,042	70	134	46	1920	660	2,92
21	0,052	108	184	72	1715	670	2,55
23	0,064	132	212	86	1605	650	2,43
26	0,095	—	—	—	—	—	—
37	0,265	238	258	158	1008	660	1,70

Die Frage, ob die Analysenwerte aus älteren Suspensionen tatsächlich die richtige stoffliche Zusammensetzung der ruhenden, aber noch lebensfähigen Keime wiedergeben oder nur abgestorbene Organismenreste charakterisieren, ist aus den oben diskutierten Gründen nicht zu entscheiden. Zweifellos ist ein Teil der Keime auch in Flüssigkeitskulturen sehr lange lebensfähig. So konnte SEIFFERT (persönliche Mitteilung) noch aus über 10 Jahre in Glasröhrchen eingeschmolzenen Suspensionen PPLO-Stämme mit Erfolg abimpfen.

Der Übergang von der stationären in die log-Phase wurde wiederum in 11 Ansätzen mit großer Einimpfmenge verschiedenen Alters (1—14 d) untersucht. Tab. 11 enthält die Absolutwerte und die Quotienten. Die Entwicklung läuft unter diesen Bedingungen innerhalb von 24 Std ab. Schon während der lag-Phase, wenn nur eine minimale Zunahme der Extinktion meßbar ist, steigt der relative RNS-Gehalt auf sein Maximum an und sinkt während der Hauptvermehrung wieder ab. Im Gegensatz zum Verhalten der L-Phase bleibt der relativ hohe Wert für DNS/Eiweiß-N lange erhalten und geht erst in der späteren stationären Phase wieder zurück. Die Mittelwerte für RNS/DNS und NS/Eiweiß-N aus allen unter-

suchten Ansätzen sind für die beiden wesentlichen Zustände in Tab. 12 zusammengefaßt.

Die endgültige Sicherheit über den NS-Gehalt und die Höhe des oxydativen Stoffwechsels während der Vermehrung von PPLO wurde wiederum durch Versuche mit wiederholter Überimpfung gewonnen. Zum Start wurde eine 48stündige Flüssigkeitskultur, die mit einem Agarstück angeimpft worden war, benützt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 10a—e enthalten.

Tabelle 12. Mittelwerte des Nucleinsäuregehaltes von PPLO zu Beginn der log- und stationären Phase.  $n = 11$

	RNS/DNS	$\sigma$ RNS/DNS	RNS Eiweiß-N $\left[ \frac{\gamma}{\text{mg}} \right]$	$\sigma$ RNS Eiweiß-N $\left[ \frac{\gamma}{\text{mg}} \right]$	DNS Eiweiß-N $\left[ \frac{\gamma}{\text{mg}} \right]$	$\sigma$ DNS Eiweiß-N $\left[ \frac{\gamma}{\text{mg}} \right]$
Maximal- werte	3,41	$\pm 0,63$	1850	$\pm 270$	680	$\pm 133$
stat. Phase	1,80	$\pm 0,32$	1110	$\pm 140$	620	$\pm 83$

Am Ende der 8stündigen lag-Phase wird das Maximum des RNS/Eiweiß-N- und RNS/DNS-Verhältnisses erreicht. Während der log-Phase liegen beide Werte wieder deutlich niedriger. Erst bei der Probe III, die aus der stationären Phase überimpft wurde und wieder eine typische lag-Phase aufweist, kommt es zu einem erneuten Anstieg dieser Werte. Der Übergang von der Ruheform in den vermehrungsfähigen vegetativen Zustand ist

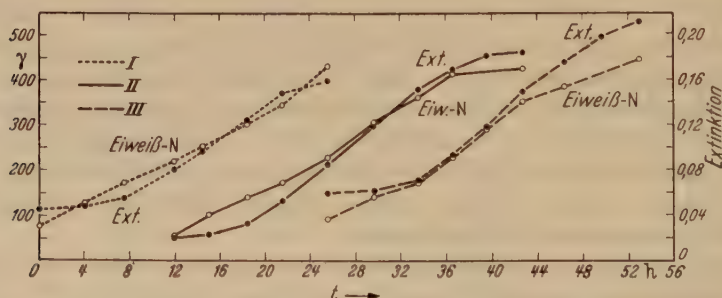


Abb. 10a. Zuwachs von PPLO bei wiederholter Überimpfung. Extinktion und Zunahme von Eiweiß-N

also mit einer vorübergehenden starken Anreicherung von RNS verbunden. Während rascher Vermehrung tritt die RNS dagegen deutlich zurück, wie die niederen Werte für RNS/Eiweiß-N und RNS/DNS der Probe II zeigen. Dies steht im Gegensatz zum Verhalten von *Proteus* und dessen *L*-Phase, bei denen gerade durch Verlängerung der log-Phase die Maximalwerte längere Zeit erhalten werden konnten.

Auch der Sauerstoffverbrauch weicht gegenüber den Verhältnissen bei den vorher untersuchten Organismen ab. Die Maxima der Kurven für den Sauerstoffverbrauch je 10 ml Suspension liegen bereits sehr früh am Beginn der log-Phase, und noch während dieser fällt die Atmung beträchtlich ab. Die Umrechnung auf die anderen Bezugsgrößen liefert

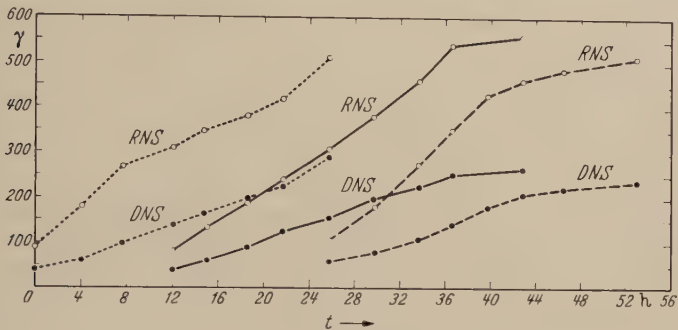


Abb. 10b. Zunahme von RNS und DNS. Jeweils pro 10 ml Suspension

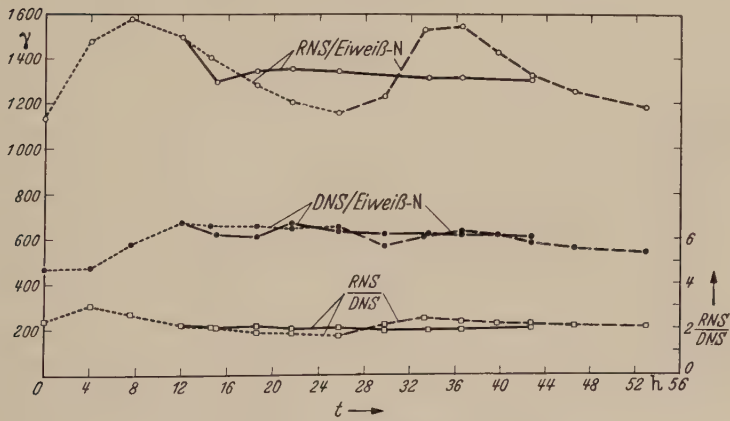


Abb. 10c. Darstellung der Quotienten aus Abb. 10a und b

daher Kurven, die alle schon während der Hauptvermehrung wieder steil abfallen. Das Maximum des oxydativen Stoffwechsels fällt mit dem Maximum der RNS-Anreicherung zusammen. Die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs ist bei den PPLO wesentlich geringer als bei *Proteus*.

### Besprechung der Ergebnisse

Aus den vorgelegten Befunden läßt sich ein Vergleich der Stoffverschiebung während der Entwicklung der 3 verschiedenen Organismenformen ziehen. Zu diesem Zweck sind die für den NS-Stoffwechsel



charakteristischsten Kurven jeweils für alle 3 Organismen auf eine Abbildung zusammengezogen. Dabei wurde die Zeitachse so verzerrt, daß immer die Kurvenpunkte für gleiche Entwicklungszustände übereinanderliegen. Wiedergegeben ist jeweils eine typische Kurve für einen Entwicklungsablauf bei Verwendung einer größeren Einimpfmenge aus der

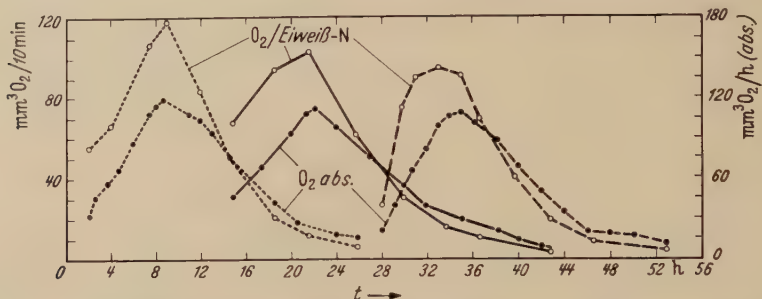


Abb. 10d. Atmungsgeschwindigkeit während der Entwicklung, bezogen auf je 10 ml Suspension bzw. 1 mg Eiweiß-N

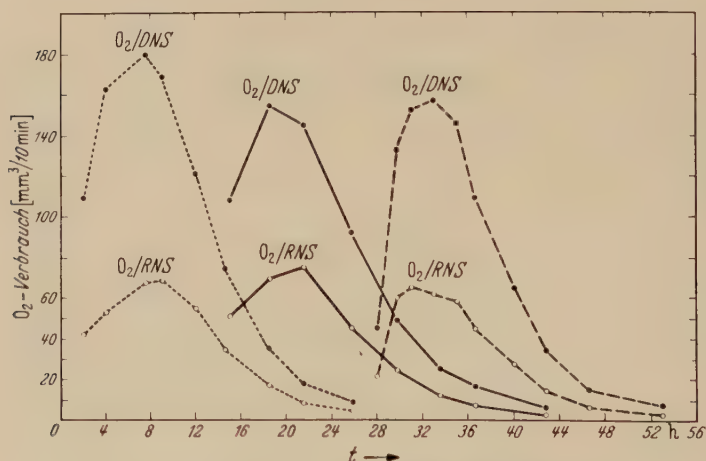


Abb. 10e. Wie Abb. 10d, aber bezogen auf DNS und RNS

frühen stationären Phase. In Abb. 11c ist die Extinktionskurve mitgezeichnet, um einen Maßstab für den Entwicklungszustand zu geben. Die aus älteren Kulturen gewonnenen Daten sind nicht mitverwendet, da es zweifelhaft ist, ob sie die Verhältnisse von lebenden Keimen oder von abgestorbenen Resten darstellen.

Abb. 11a ermöglicht den Vergleich des Quotienten DNS/Eiweiß-N. Sie zeigt, daß die L-Phase in allen Entwicklungszuständen um rund 25% DNS reicher ist als die Bakterienform. Der Kurvencharakter ist praktisch

gleichartig. Die PPLO besitzen etwa den gleichen DNS-Gehalt wie die L-Phase, aber der Kurvenverlauf unterscheidet sich von dem der L-Phase durch das wesentlich langsamere Absinken nach dem Aufhören des Zuwachses.

Einschneidender sind die Unterschiede zwischen den 3 Organismen im RNS-Gehalt. Wie Abb. 11b veranschaulicht, liegt er bei der L-Phase durchschnittlich 50% unter dem der Bakterienform. Der Kurvencharakter ist aber für beide gleich, denn die prozentuale Schwankung im RNS-Gehalt beim Übergang von der stationären in die log-Phase beträgt in beiden Fällen rund 300%. Demgegenüber schwankt er bei den PPLO nur um rund 50% und liegt im Maximum etwa 50% niedriger als der der L-Phase.

Die größten Abweichungen ergeben sich beim Vergleich des Quotienten RNS/DNS, den Abb. 11c zeigt. Wiederum ein starker quantitativer Unterschied zwischen L-Phase und Bakterienform, bei weitgehend gleichartigem Kurvencharakter. Die PPLO dagegen zeichnen sich dadurch aus, daß die Kurve wesentlich flacher verläuft und das Maximum an das Ende der lag-Phase verschoben ist. Das starke Zurücktreten der RNS, selbst während der Vermehrung, scheint ein sehr charakteristisches Merkmal der PPLO zu sein. Wenn auch bisher nur eine recht beschränkte Anzahl von Bakterien auf ihr RNS/DNS-Verhältnis untersucht worden ist und nur selten Angaben über die Veränderungen während des Wachstums vorliegen, so lassen die bis jetzt

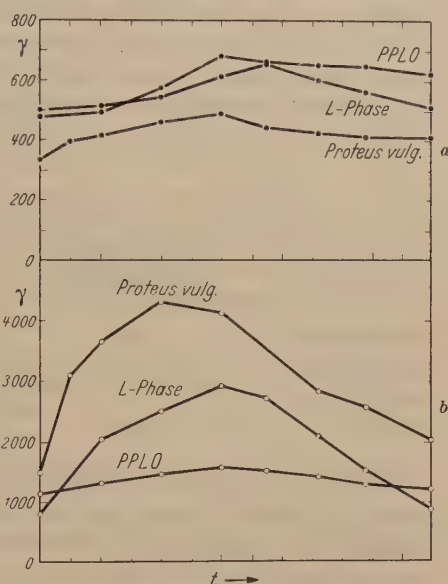


Abb. 11a. Vergleichende Darstellung der Abhängigkeit des Quotienten DNS/Eiweiß-N vom Entwicklungszustand der 3 untersuchten Organismen  
Abb. 11b. Gleiche Darstellung wie Abb. 11a, aber für RNS/Eiweiß-N

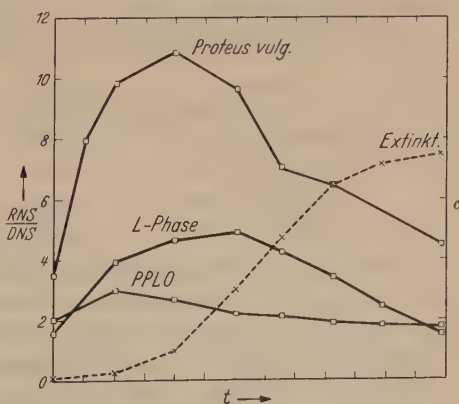


Abb. 11c. Gleiche Darstellung wie Abb. 11a, aber für RNS/DNS

bekannten Daten (eine Reihe von Bakterien haben kürzlich RIPPPEL u. BUSCH, 1954, untersucht) immerhin vermuten, daß eine so starke Reduktion der RNS bei Bakterien nicht vorkommt.

Ein weiterer Unterschied ergibt sich beim Vergleich des oben nicht näher besprochenen Lipoid-Phosphats. Bezieht man den vom Entwicklungszustand weitgehend unabhängigen Phosphatgehalt der Lipoidfraktion auf Eiweiß, so ergeben sich die in Tab. 13 enthaltenen Zahlen.

Tabelle 13. Mittlerer Gehalt der Lipoidfraktion an  $PO_4'''$ , bezogen auf 1 mg Eiweiß-N

Organismen	Lipoidgebundenes $PO_4'''$ /mg Eiweiß-N
<i>Proteus vulgaris</i> .	65
Stabile L-Phase .	120
PPLO (Stamm Findlay) . . . .	40

Demnach enthält die L-Phase etwa doppelt soviel lipoidgebundenes Phosphat wie die Bakterienform, während die PPLO den geringsten Wert aufweisen. Dies stimmt mit der Beobachtung von VENDRELY u. TULASNE (1953) überein, die bei der L-Phase einen sehr hohen Gesamtlipoidgehalt fanden.

Mit dem Zurücktreten der RNS geht die Verminderung der Atmungsintensität parallel. Wenn man die während der Entwicklung maximal erreichte Sauerstoffaufnahme auf Eiweiß-N bzw. DNS bezieht (Tab. 14), so zeigt sich von *Proteus* über die L-Phase zu den PPLO eine fortschreitende Abnahme auf jeweils 1/3. Man darf aber aus dieser Tatsache nicht schließen, daß die Bedeutung des oxydativen Stoffwechsels für die Syntheseleistung in ähnlichem Umfang abnimmt. Dies läßt sich zeigen, wenn man berechnet,

Tabelle 14. Vergleich der maximalen Atmungsgeschwindigkeit der 3 untersuchten Organismen, bezogen auf 1 mg Eiweiß-N bzw. 1 mg DNS

Organismen	$-O_2$	$-O_2$
	mg Eiweiß-N · h	mg DNS · h
<i>Proteus vulgaris</i> .	5000	11000
Stabile L-Phase .	1800	3000
PPLO (Stamm Findlay) . . . .	600	900

wieviel Sauerstoff verbraucht wird, wenn 1 mg N aus der Nährlösung zu körpereigener Substanz assimiliert bzw. wenn 1 mg DNS einschließlich der übrigen zugehörigen Körpersubstanz neu aufgebaut wird. Die Berechnung ist aus den Versuchsansätzen mit wiederholter Überimpfung ohne weiteres möglich, weil dort Sauerstoffverbrauch und Substanzzunahme an gleichen Proben gemessen wurden. Tab. 15 enthält die entsprechenden Daten. Sie sind für 2 Abschnitte getrennt berechnet. Einmal für die lag-Phase mit Einschluß des ersten Intervalls der log-Phase (3. Entnahme) und das andere Mal für den Gesamtzuwachs vom Beginn bis zum Ende der log-Phase unter Ausschluß des stationären Abschnittes.



Es ergibt sich die zunächst unerwartete Tatsache, daß *Proteus* und die PPLO praktisch den gleichen Sauerstoffverbrauch beim Aufbau einer gewissen Menge Körpersubstanz haben. Er ist in beiden Fällen während der Anlaufphase größer als für das Gesamtwachstum. Die L-Phase hat in der Anlaufphase einen sehr stark erhöhten Sauerstoffbedarf, doch dürfte er während der eigentlichen Vermehrungsphase nicht größer sein als der der Bakterienform, wie der niedrige Wert für das Gesamtwachstum, in dem der hohe Anfangswert mit enthalten ist, anzeigt.

Tabelle 15. Sauerstoffverbrauch während der Synthese von 1 mg DNS, bzw. des Einbaues von 1 mg N in körpereigene Substanz

Organismen	Wachstum bis z. frühen log-Phase		Wachstum bis zur stat. Phase	
	—O <sub>2</sub> /mg Ges.-N	—O <sub>2</sub> /mg DNS	—O <sub>2</sub> /mg Ges.-N	—O <sub>2</sub> /mg DNS
<i>Proteus vulg.</i> . .	4200	17000	3200	10000
Stabile L-Phase	9500	36000	5400	12000
PPLO (Stamm				
Findlay) . . .	4500	8700	3500	8000

Zusammenfassend kann als Ergebnis vorliegender Untersuchungen folgendes festgestellt werden:

1. Die Umwandlung von *Proteus vulgaris* in die stabile L-Phase ist mit einer starken quantitativen Verschiebung im NS-Stoffwechsel verbunden. Das Verhältnis RNS/DNS wird um die Hälfte vermindert, weist aber prinzipiell die gleichen Schwankungen im Entwicklungsablauf auf wie bei der Bakterienform. Der Gehalt an DNS ist erhöht, und die Verminderung des Gesamtnucleinsäuregehaltes beruht ausschließlich auf dem Zurücktreten der RNS.
2. Die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme ist bei der L-Phase auf 30% reduziert, aber der Anteil des oxydativen Stoffwechsels am Aufbau der Körpersubstanz ist nicht wesentlich verändert, weil auch die Wachstumsgeschwindigkeit entsprechend verlangsamt ist.
3. Die PPLO weisen wie die L-Phase einen erhöhten DNS-Gehalt auf. Die Reduktion der RNS ist aber erheblich stärker und der Quotient RNS/DNS zeigt nur geringe Schwankungen im Entwicklungsablauf. Sie scheinen sich dadurch deutlich von den Bakterien und L-Phasen zu unterscheiden. Leider fehlen bisher zuverlässige Angaben über die NS-Zusammensetzung der großen tierpathogenen Viren, die im wesentlichen DNS enthalten, aber nicht frei von RNS sein sollen (vgl. SCHRAMM 1954). Es wäre denkbar, daß sich die PPLO auch auf Grund ihrer NS-Zusammensetzung in die Lücke zwischen Bakterien und großen Viren einfügen ließen, wohin sie wegen ihrer Morphologie und Größe seit längerer Zeit gestellt werden (RUSKA u. POPPE, 1947, EDWARD, 1954).

Die starken quantitativen Verschiebungen im NS-Stoffwechsel legen die Vermutung nahe, daß bei der Umwandlung in die L-Phase auch qualitative Veränderungen in der NS-Zusammensetzung auftreten. Deren Erfassung würde vermutlich einen wesentlichen Beitrag zur Frage nach dem Wesen dieses heute noch rätselhaften Vorganges bedeuten.

### Zusammenfassung

Flüssigkeitskulturen von *Proteus vulgaris*, dessen stabiler L-Phase und eines PPLO-Stammes wurden in verschiedenen Entwicklungszuständen auf ihren Gehalt an RNS, DNS und Eiweiß untersucht. Gleichzeitig erfolgte auch die Messung des Sauerstoffverbrauches.

Bei *P. vulgaris* fällt das Maximum des NS-Gehaltes und des Quotienten RNS/DNS in die frühe log-Phase. Während der Quotient DNS/Eiweiß-N zwischen stationärer und log-Phase nur eine Differenz von 50% aufweist, schwanken RNS/DNS und RNS/Eiweiß-N um 300%. Der maximale Sauerstoffverbrauch in der frühen log-Phase beträgt rund 5000 mm<sup>3</sup> je mg Eiweiß-N/Std. Um die Bakterienmasse um 1 mg N zu vermehren, werden im Mittel einer Wachstumsperiode 3200 mm<sup>3</sup> Sauerstoff verbraucht.

Die stabile L-Phase von *P. vulgaris* hat einen um rund 25% erhöhten DNS-Gehalt, während der RNS-Gehalt gegenüber der Bakterienform um 50% geringer ist. Der Quotient RNS/DNS zeigt die gleiche Abhängigkeit vom Entwicklungszustand wie bei *P. vulgaris*, liegt aber selbst im Maximum um 50% niedriger und sinkt in alten Suspensionen unter 1,0 ab. Die maximale Atmungsgeschwindigkeit beträgt 1800 mm<sup>3</sup>/mg Eiweiß-N/Std. Während des Zuwachses von 1 mg Gesamt-N werden 5400 mm<sup>3</sup>/O<sub>2</sub> verbraucht.

Die PPLO unterschieden sich von den beiden oben erwähnten Formen durch starke Reduktion des RNS-Gehaltes, der während des Entwicklungsablaufes nur um etwa 30% schwankt. Der DNS-Gehalt entspricht dem der L-Phase. Die Atmungsintensität ist mit 600 mm<sup>3</sup>/mg Eiweiß-N/Std sehr niedrig, aber der Sauerstoffverbrauch während des Zuwachses einer 1-mg-Gesamt-N bzw. DNS entsprechenden Organismenmasse beträgt wie bei *P. vulgaris* 4500 bzw. 8000 mm<sup>3</sup>. Unter aeroben Bedingungen ist also der oxydative Stoffwechsel für die Syntheseleistung bei den PPLO ebenso bedeutend wie bei *P. vulgaris*.

### Literatur

- BELOZERSKY, A. N.: Symposia on quantitative Biology 12, 1 (1947).  
COHEN, S. S.: Symposia on quantitative Biology 12, 35 (1947).  
DIENES, L.: J. Inf. Dis. 65, 24 (1939). — J. Bacter. 57, 529 (1949). — DIENES, L., and W. E. SMITH: J. Bacter. 48, 145 (1944). — DIXON, M.: Manometric Methods. Cambridge 1951.

EDWARD, D. G.: J. Gen. Mikrobiol. **10**, 27 (1954).

GERBER, G.: Z. Naturforsch. **10b**, 382 (1955). — GRASSET, E., u. V. BONIFAS: Schweiz. Z. allg. Path. **18**, 1074 (1955).

HAHN, L., u. H. v. EULER: Ark. Chem. Mineral. Geol. A **22/23**, 1 (1946). — HEILINGER, F.: Beitr. z. Biol. d. Pflanzen **30**, 179 (1954). — HOEPKEN, W., u. K. BARTMANN: Zbl. Bakter. I Orig. **162**, 372 (1955).

KANDLER, G., u. O. KANDLER: Arch. Mikrobiol. **21**, 178 (1954). — Z. Bakter. II. Abt. **108** (1955). — Z. Naturforsch. 1956 (im Druck). — KANDLER, G., O. KANDLER u. O. HUBER: Arch. Mikrobiol. **21**, 202 (1954). — KELLENBERGER, E., u. K. LIEBERMEISTER: Z. Naturforsch. (im Druck) (1956). — KLEIN, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse. Wien 1931. — KLIENEBERGER-NOBEL, E.: J. of Path. **40**, 93 (1935).

MARTLAND, M., and R. ROBISON: Biochemic. J. **20**, 848 (1926). — MALMGREEN, B., u. C. G. HEDEN: Acta path. scand. (Copenh.) **24**, 417 (1947a); **24**, 438 (1947b); **24**, 448 (1947c); **24**, 472 (1947d); **24**, 496 (1947e). — MORSE, M. L., and C. E. CARTER: J. Bacter. **58**, 317 (1949).

PRITZWITZ, u. GAFFRON, J. v.: Naturwissenschaften **40**, 590 (1953).

RIPPEL-BALDES, A., u. G. BUSCH: Nachr. Akad. Wiss. Göttingen Math.-Physik. Kl. IIb **1954**, 23 (1954). — RUSKA, H., u. K. POPPE: Z. Naturforsch. **2b**, 35 (1947).

SCHELLENBERG, H.: Zbl. Bakter. I. Orig. **161** (1954). — SCHRAMM, G.: Biochemie der Viren. Berlin, Göttingen, Heidelberg: Springer 1954. — SHERRATT, H. S. A., and A. J. THOMAS: J. Gen. Mikrobiol. **8**, 217 (1953). — STEMPEN, H., and W. G. HUTCHINSON: J. Bacter. **61**, 321 (1951).

TULASNE, R.: C. r. Soc. Biol. (Paris) **143**, 286 (1949).

VENDRELY, R., and R. TULASNE: Nature (Lond.) **171**, 262 (1953).

WELLERSON, R., and P. A. TETRAULT: J. Bacter. **69**, 449 (1955).



(Aus dem Botanischen Institut der Universität München)

## Über Veränderungen des Nucleinsäuregehaltes von *Proteus vulgaris* während der durch Penicillin ausgelösten Umwandlung in die L-Phase

Von

OTTO KANDLER, JOHANNES MÜLLER und CLAUS ZEHENDER\*

Mit 9 Textabbildungen

(Eingegangen am 2. Februar 1956)

Durch die Entdeckung von DIENES (1949), daß sich die Umwandlung von *Proteus vulgaris* und anderen Bakterien in die L-Phase mit Hilfe von Penicillin jederzeit reproduzieren läßt, war die Voraussetzung für eine experimentelle Bearbeitung dieses Phänomens gegeben.

Dementsprechend liegen heute eine Reihe von morphologischen Untersuchungen über die Umwandlung der Bakterienform in die „large bodies“ und deren Auskeimen in die L-Phase vor. Letzteres wurde in neuerer Zeit besonders klar von LIEBERMEISTER (1955) und HÖPKEN u. BARTMANN (1955) in fortlaufenden Phakoaufnahmen dargestellt. Eingehende quantitative Studien über die Abhängigkeit der Entstehung von L-Phasen-Kolonien vom Entwicklungszustand der Bakterien, in dem sie der Penicillineinwirkung ausgesetzt werden, führten LIEBERMEISTER (1953) und KELLENBERGER u. LIEBERMEISTER (1956) durch. Sie konnten zeigen, daß unter günstigen Bedingungen eine Ausbeute von 10—15% erreicht werden kann.

Alle bisherigen Arbeiten zeigen, daß im Flüssigen zwar „large bodies“ gebildet werden, aber keine Weiterentwicklung in der typischen L-Form erfolgt. Die großen Blasen platzen nach einiger Zeit, aber aus dem freigesetzten Zellschutt erfolgt in keinem Falle eine Weiterentwicklung, wie ursprünglich irrtümlicherweise vielfach angegeben wurde. Erst nach Übertragung auf günstige feste Substrate keimen die large bodies aus, wobei sie vorwiegend in den Agar hineinwachsen (HÖPKEN u. BARTMANN, 1955). Auch die weitere Vermehrung in der L-Phase erfolgt dann durch multipolare Knospung (KANDLER u. KANDLER, 1954). Die Ausbildung der large bodies scheint nach den Untersuchungen von SCHELLENBERG (1955) und KELLENBERGER u. LIEBERMEISTER (1956) mit einer Vermehrung der Desoxyribonucleinsäure verbunden zu sein, denn in beiden Arbeiten konnte eine Vermehrung der feulgenpositiven, bzw. mit HCl-Giemsa färbbaren Körperchen nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den morphologischen Untersuchungen sind physiologische Arbeiten über diese Umwandlung praktisch nicht vorhanden. Leider fehlen bisher auch eindeutige Ergebnisse über die genaue biochemische Wirkung des Penicillins auf die Bakterien. Die vielen derartigen Versuche ergaben bisher nur eine große Wahrscheinlichkeit für die Beeinflussung der Ribonucleinsäure und damit für einen Eingriff in die Eiweißsynthese (vgl. EAGLE u. SAZ, 1955). Über die Wirkung von

\* Die Arbeit ist ein Auszug aus der von J. MÜLLER bei der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München vorgelegten Dissertation gleichen Titels.

Penicillin auf *Proteus vulgaris*, insbesondere unter Bedingungen, die zur Entstehung von large bodies führen, liegen bisher keine Untersuchungen vor. Dagegen wurde von RIPPEL u. BUSCH (1954) die Veränderung des Nucleinsäuregehaltes bei der Bildung von Involutionsformen verschiedener Bakterien untersucht. Sie zeigten, daß allgemein eine Verschiebung zugunsten der DNS eintrat. Es ist allerdings fraglich, ob die durch hohe Salzkonzentrationen erzeugten Involutionsformen etwas mit den unter Penicillineinfluß entstehenden large bodies, die zu L-Phasen führen, zu tun haben, da sie bisher noch nie zur Weiterentwicklung gebracht werden konnten. Die Weiterkultur in wiederholten Passagen ohne Rückschlagen in die Bakterienform muß aber als Voraussetzung für die Verwendung der Bezeichnung „L-Phase“ gefordert werden.

Nachdem wir kürzlich fanden, daß sich die stabile L-Phase durch einen erhöhten DNS-Gehalt und einen verminderten Quotienten RNS/DNS von der Bakterienform unterscheidet (KANDLER u. Mitarb., 1956), untersuchten wir nunmehr, ob sich eine derartige charakteristische Verschiebung auch schon im Frühstadium der Umwandlung, bei der Bildung der large bodies nachweisen läßt. Vergleichsweise wurde auch der Einfluß anderer Substanzen, die das Bakterienwachstum hemmen und deren Wirkungsmechanismus weitgehend bekannt ist, in gleicher Weise untersucht. In allen Fällen erschien es uns wichtig, nicht bestimmte einzelne Zustände zu analysieren, sondern den Entwicklungsablauf durch möglichst häufige Probeentnahme zu erfassen, da besonders der Nucleinsäuregehalt stark entwicklungsabhängig ist. Ein vollständiges Bild kann nur der Vergleich von Entwicklungsgängen geben.

### Material und Methodik

Zu den Untersuchungen wurde der *Proteus*-Stamm 52 von DIENES verwendet. Alle Kultur- und Bestimmungsmethoden waren die gleichen wie bei der vorhergehenden Arbeit (KANDLER u. Mitarb., 1956) und brauchen daher an dieser Stelle nicht wiederholt zu werden.

### Versuchsergebnisse

#### 1. Untersuchung des Sauerstoffverbrauches während der Umwandlung

Aus einer 24 Std alten Flüssigkeitskultur von *P. vulgaris* wurden 50 ml abzentrifugiert und in 1 l frische Nährlösung übertragen. Je 3 ml davon wurden dann in die Atmungströge der WARBURG-Apparatur gegeben und fortlaufend die Sauerstoffaufnahme gemessen. Während 2 Gefäße kein Penicillin enthielten, wurde bei je 2 Gefäßen nach verschiedenen Zeiten Penicillin aus dem seitlichen Ansatz zugegeben, so daß eine Endkonzentration von 150 IE/ml erreicht wurde. Abb. 1 zeigt das Ergebnis. Bei einer Zugabe 30 min nach Überimpfung, also am Ende der log-Phase, bleibt die Atmung zunächst noch etwa 1 Std unverändert und sinkt dann sehr stark bis auf  $\frac{1}{4}$  des ursprünglichen Wertes ab. Die morphologische Untersuchung (bei einem der beiden Gefäße wurde die Messung in

Abständen von 30 min kurz unterbrochen und eine Öse Suspension entnommen) ergab, daß der überwiegende Teil der Bakterien nach 1 Std lysierte, ohne large bodies zu bilden. Auch die wenigen entstehenden large bodies platzten im Laufe der nächsten Stunden.

Die 2. Zugabe erfolgte nach dem Einsetzen der log-Phase. Die Atmungsintensität blieb etwa 30 min auf der ursprünglichen Höhe und sank dann auf 50% ab. Im Laufe der nächsten Stunden stieg sie dann wieder leicht an. Die mikroskopische Kontrolle zeigte, daß nicht mehr so viele Bakterien

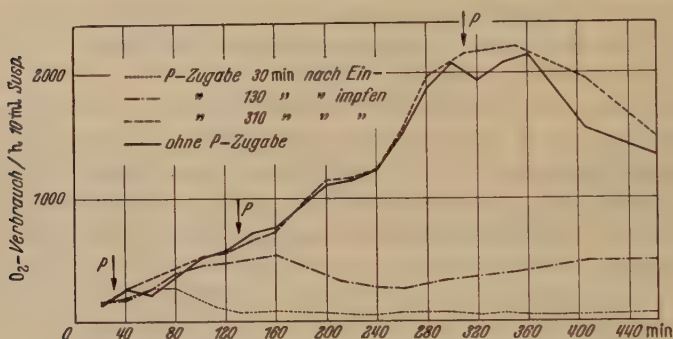


Abb. 1. Sauerstoffverbrauch je 10 ml Suspension. Mittelwerte von je 2 Parallelproben. Zugabe von 150 IE/ml Penicillin 30, 130 und 310 min nach der Beimpfung

lysierten und der größte Teil zu large bodies wurde. Der starke Abfall der Atmung dürfte wie bei der früheren Zugabe durch die Lyse der Bakterien bedingt sein. Der langsame Anstieg fällt mit der Vergrößerung der large bodies zusammen. Die Kurve stimmt mit den von LIEBERMEISTER (1953) veröffentlichten Extinktionskurven gut überein.

Die interessanteste Beobachtung lieferte zweifellos die Zugabe zu Beginn der stationären Phase (6 Std). In diesem Fall wird keine wesentliche Veränderung der Atmungsintensität bewirkt. Es kommt zu keiner Hemmung gegenüber der Kontrolle, sondern sogar zu einer leichten Verzögerung des normalen Abfalls. Trotzdem aber erfolgte eine beinahe 100%ige Umwandlung der Bakterien. Sie führte allerdings nicht zu großen vakuolisierten large bodies, sondern nur zu kleineren Anschwellungen und typischen Winkelformen, wie sie in Abb. 2a abgebildet sind. Dieses Verhalten haben schon LIEBERMEISTER (1953) und KELLENBERGER u. LIEBERMEISTER (1956) eingehender beschrieben. Demnach führt Penicillin trotz tiefgreifenden Eingriffen in die Zelle nicht primär zu einer allgemeinen Atmungshemmung. Andererseits ist aber auch keine Förderung der Atmung festzustellen, wie man sie auf Grund der starken morphologischen Veränderung, der Ausbildung der large bodies, die auf



eine Substanzvermehrung hinweist, hätte erwarten können. Anscheinend ist mit der Umwandlung keine Neusynthese, sondern nur eine Umorganisation schon vorhandenen Materials verbunden.

## 2. Veränderungen im Nucleinsäuregehalt während der Umwandlung

Die Untersuchung des NS-Gehaltes teilweise lysierter Kulturen, wie man sie bei Zugabe hoher Penicillindosen erhält, wäre sinnlos gewesen, weil bei der Lyse ein Teil der Zellbestandteile in Lösung geht. Es wurde

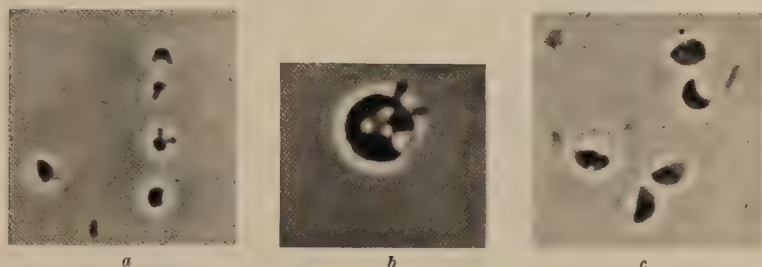


Abb. 2. Phasenkontrast-Mikrophotographien von Umwandlungsstadien: *a* Typische Winkelform; Frühstadium der large bodies (Gesamtvergrößerung 1000mal). *b* Fortgeschrittenes Umwandlungsstadium; large body mit Resten der Bakterienzelle (Gesamtvergrößerung 2000mal). *c* Älteres Umwandlungsstadium; stark vakuolisierte large bodies (Gesamtvergrößerung 1000mal)

daher versucht, durch Verminderung der Penicillinkonzentration auch während der log-Phase die Umwandlung so langsam ablaufen zu lassen, daß keine Lysen eintreten. Wie Vorversuche zeigten, ist dies möglich, wenn man nur 1—7 IE/ml zugibt. Bei 1 IE/ml macht sich nach etwa 2 Std eine Teilungshemmung bemerkbar. Die Bakterien trennen sich nicht mehr wie üblich voneinander ab, sondern ziehen sich wurstartig auseinander, wie es auf der elektronenmikroskopischen Aufnahme in Abb. 3 deutlich zu sehen ist. Nach längerer Zeit treten dann auch Anschwellungen auf.

Verwendet man 4 IE/ml (Zugabe während der log-Phase), so treten im Laufe von 3—4 Std Frühstadien der large bodies, wie sie Abb. 2b zeigt, auf. Sie wachsen langsam heran und erst nach etwa 12 Std sind sie stark vakuolisiert wie in Abb. 2c und platzen dann allmählich. Die Anzahl der lysierenden Bakterien ist sehr gering. Bei den folgenden Versuchen wurden daher bei Zugabe in der log-Phase stets geringe Konzentrationen verwendet. Zu Beginn der stationären Phase sind diese allerdings wirkungslos und wurden dann durch hohe (1000 IE) ersetzt.

Um die stofflichen Veränderungen parallel zu den eben beschriebenen morphologischen erfassen zu können, wurde wie folgt verfahren:

Aus einer etwa 48stündigen Agarkultur wurden 300 ml flüssiger Nährboden angeimpft und 24 Std bei 27° C auf der Schüttelmaschine bebrütet.

100 ml dieser Suspension wurden unter sterilen Bedingungen bei 10000 g (10 min) sedimentiert und in 1 l frische Nährlösung eingimpft. Von 2 oder 3 Parallelproben blieb eine ohne Zusatz, während die andere nach einer bestimmten Zeit mit Penicillin versetzt wurde. In verschiedenen Intervallen wurden dann Proben von je 100 ml entnommen und nach dem früher (KANDLER u. Mitarb.) beschriebenen Schema aufgearbeitet. Die Mitführung einer Kontrolle erwies sich als unbedingt erforderlich, da der

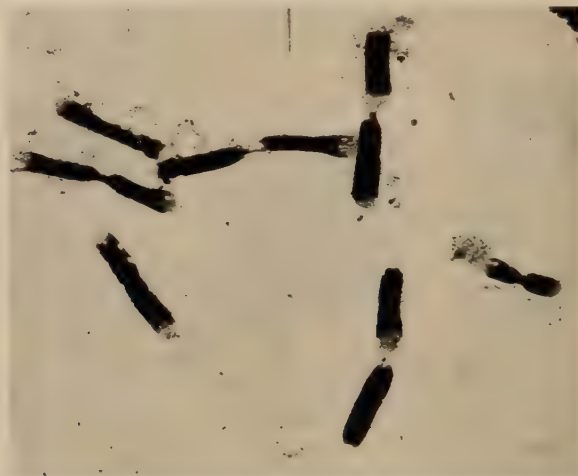


Abb. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Proteus vulgaris*, 2 Std nach Zugabe von 1 IE/ml Penicillin. Mit Titandioxyd bedampft. Gesamtvergrößerung 3200mal

Wachstumsverlauf doch nicht immer völlig identisch ist und die durch Penicillin bewirkten Veränderungen nicht immer einwandfrei erfaßt werden könnten.

Abb. 4a und b geben die Verhältnisse bei Zugabe nach 30 min wieder. Im 1. Intervall ist praktisch keine Veränderung zu erkennen. Auch morphologisch zeigte sich noch keine Unregelmäßigkeit. 1 Std später weisen dagegen sowohl RNS als auch der Eiweiß-N eine erhebliche Verringerung der Zunahme auf, während die DNS-Zunahme noch nicht vermindert ist. Dementsprechend ergeben sich bei den Quotienten DNS/Eiweiß-N und RNS/DNS starke Abweichungen gegenüber der Kontrolle. Dagegen verändert sich der Quotient RNS/Eiweiß-N nur geringfügig innerhalb der Fehlergrenze. Die Hemmung der Eiweiß- und RNS-Synthese geht demnach vollkommen parallel. Die mikroskopische Kontrolle zeigte zu diesem Zeitpunkt die ersten Anschwellungen und Winkelformen.

Im weiteren Verlauf blieben RNS und Eiweiß auf gleicher Höhe und nur DNS nahm noch geringfügig zu, während die morphologischen Veränderungen weiterliefen und bei Versuchsende der größte Teil der Zellen

in typischen Winkelformen vorlag. In einigen Fällen waren auch schon größere large bodies zu finden. Der Quotient DNS/Eiweiß-N liegt bei diesen Formen um rund 30% über dem Wert der unveränderten Bakterien. Die Erhöhung des RNS/Eiweiß-N-Verhältnisses ist demgegenüber nur geringfügig und nicht signifikant.

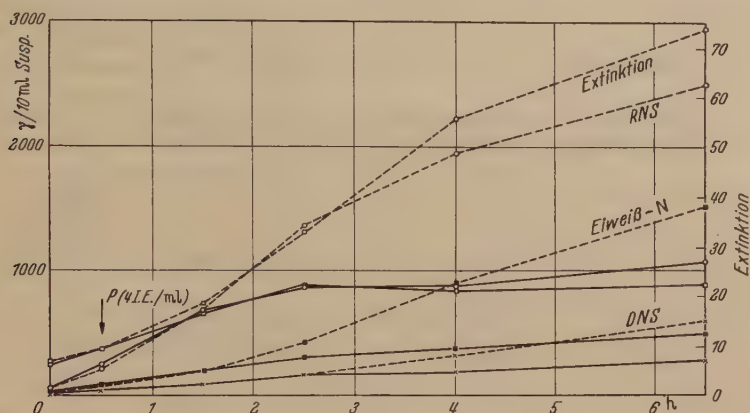


Abb. 4a. Absolutzunahmen an Extinktion, RNS, DNS und Eiweiß-N mit und ohne Zusatz von 4 IE/ml Penicillin. — — — ohne, — mit Penicillin

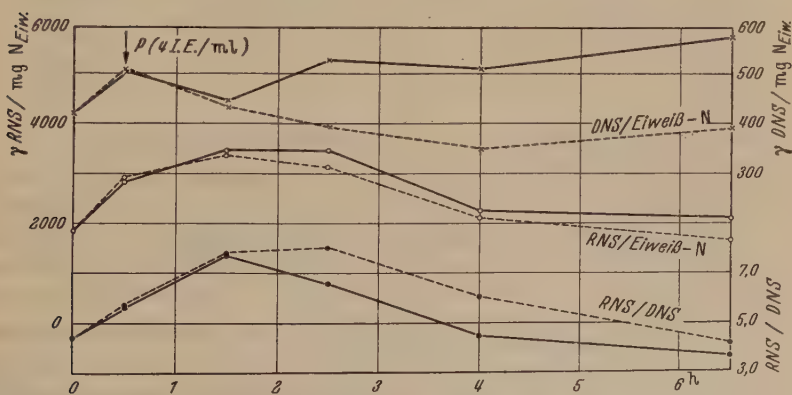


Abb. 4b. Quotienten aus 4a. Markierung wie 4a

Ganz ähnliche Verhältnisse ergaben sich auch bei der Zugabe nach 1½ und nach 3 Std. Im letzteren Fall sinkt der Quotient RNS/DNS auch bei der Kontrolle ab und der Unterschied zur Probe mit Penicillinzusatz ist nicht mehr so ausgeprägt. In beiden Fällen ist aber die relative Erhöhung des DNS-Gehaltes gegenüber dem Eiweißgehalt deutlich.

Gibt man Penicillin erst zu Beginn der stationären Phase zu, so muß man, wie bereits erwähnt, sehr hohe Konzentrationen benutzen, um noch



eine Umwandlung zu erzielen, die allerdings nur bis zur Winkelform führt. Wie Abb. 5a und b zeigen, bewirken 1000 IE/ml bei einer 5 Std alten Kultur zunächst eine völlige Hemmung des Absolutzuwachses an Eiweiß. RNS wird sogar absolut weniger, was bei den L-Phasen nach Abschluß der Hauptvermehrung immer beobachtet werden konnte

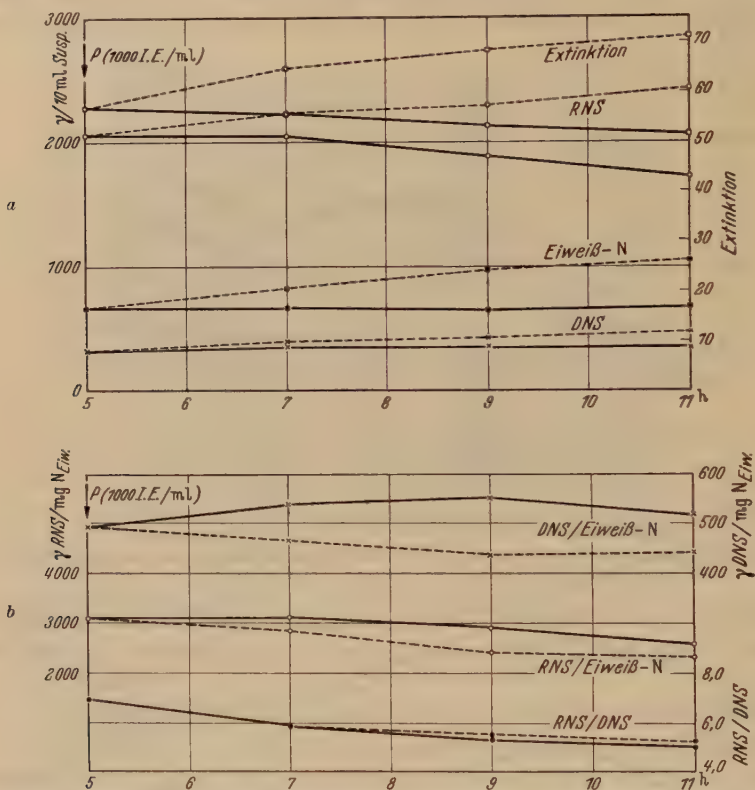


Abb. 5a u. b. Entsprechende Darstellung wie 4a und b, aber Zugabe von 1000 IE/ml Penicillin zu einer 5stündigen Kultur. Signatur wie Abb. 4a und b

(KANDLER u. Mitarb., 1956), und die DNS nimmt nur sehr geringfügig weiter zu. Dementsprechend ergibt sich auch in diesem Fall eine deutliche Erhöhung des DNS/Eiweiß-N-Verhältnisses, die als wesentliches Kennzeichen für die stofflichen Veränderungen während der L-Umwandlung angesehen werden darf. Der Quotient RNS/DNS hat in diesem späten Entwicklungszustand bereits einen sehr niederen Wert erreicht und wird nur noch unwesentlich gesenkt. Im Gegensatz zu den Versuchen, in denen Penicillin während der log-Phase zugesetzt worden war, ergibt sich nunmehr auch für den Quotienten RNS/Eiweiß-N eine zwar schwache, aber doch deutliche relative Erhöhung. Sie kommt durch eine Verzögerung des

bei der Kontrolle durch das Überwiegen der Eiweiß- über die RNS-Synthese einsetzenden Abfalles zustande. Ganz allgemein ist der NS-Reichtum der large bodies also nicht auf eine besonders starke Vermehrung der Nucleinsäuren, sondern auf eine relativ stärkere Hemmung der Eiweißsynthese zurückzuführen. Die Umwandlung ist demnach nicht mit einer Bruttovermehrung an Bakterienmasse verbunden, sondern stellt lediglich eine Umorganisierung des vorhandenen Materials dar. Damit ist auch das Gleichbleiben der Atmungsintensität verständlich.

Tabelle 1. *Veränderungen in der NS-Zusammensetzung der stabilen L-Phase von P. vulgaris im Laufe der Entwicklung mit und ohne Zusatz von 1000 IE/ml Penicillin. Alle Angaben in  $\gamma$ /10 ml Suspension*

Zeit [h]		0	13	15 ½	17 ½	19 ½	21 ½	23 ½	25 ½
Extinktion . . .	—	2,0	5,8	12,3	20,5	28,0	34,7	36,4	37,0
	+	2,1	6,0	12,6	20,7	28,0	35,1	36,6	37,7
RNS . . . . .	—	26	456	795	1165	1545	1870	1660	1480
	+	26	462	810	1165	1565	1820	1675	1500
DNS . . . . .	—	31	114	166	239	352	456	442	435
	+	31	112	170	241	348	439	435	435
RNS/DNS . . .	—	0,85	4,09	4,8	4,88	4,40	4,10	3,76	3,4
	+	0,85	4,12	4,75	4,83	4,50	4,15	3,85	3,45
Eiweiß-N . . .	—	65	220	320	399	544	797	855	925
	+	65	225	330	410	560	770	850	950

Mit der hier verwendeten Methode konnten allerdings nur Veränderungen in der Bruttozusammensetzung festgestellt werden, aber keine Aussagen über die Geschwindigkeit des Stoffumsatzes gemacht werden. Es ist durchaus denkbar, daß während der Umwandlung ein Teil des vorhandenen Materials abgebaut und neu synthetisiert wird, doch lassen sich derartige Vorgänge nur durch Verwendung von Isotopen darstellen.

Bekanntlich sind die aus den large bodies entstehenden L-Phasen penicillinresistent. An einer auch im Flüssigen wachsenden stabilen L-Phase, die schon 150 Passagen auch ohne Penicillin in der L-Form wächst ohne in die Bakterienform zurückzuschlagen, versuchten wir, ob bei diesen Stämmen der Zusatz von hohen Dosen Penicillin tatsächlich ganz ohne Wirkung ist. Es wurde daher wie bei den Versuchen mit der Bakterienform eine größere Organismenmasse (14 Std alte Kultur) eingepft und wie üblich in Abständen von einigen Stunden Proben entnommen und auf ihren NS-Gehalt untersucht. Tab. 1 enthält die entsprechenden Werte für eine Probe ohne und mit 1000 IE Penicillin/ml. Die Zahlen zeigen, daß die L-Phase durch Penicillin weder gehemmt noch gefördert wird.

### 3. Versuche über die Wirkung verschiedener Stoffwechselgifte auf die NS-Zusammensetzung von *P. vulgaris*

Um zu zeigen, daß die durch Penicillin verursachten Verschiebungen im NS-Gehalt nicht nur eine allgemeine Begleiterscheinung jeder beliebigen Hemmung des Bakterienwachstums, sondern spezifisch sind, wurde die Wirkung einiger Stoffwechselgifte, deren Angriffspunkt weitgehend bekannt ist, in gleicher Weise untersucht. Als typisches Gift des Kohlenhydratstoffwechsels, das durch die Hemmung der Triosephosphatdehydrase direkt in den Abbauweg der Glucose eingreift (vgl. JAMES, 1954) wurde Monojodessigsäure (MJ) gewählt. Sie hemmt zwar in höheren Konzentrationen auch andere SH-Gruppen-Fermente, wurde aber in unseren Versuchen nur in sehr geringer Konzentration verwendet, so daß es sich vorwiegend um die spezifische Hemmung handeln dürfte. Ebenfalls ein Gift des Atmungsstoffwechsels, das aber nicht in den direkten Abbauweg eingreift, sondern durch Verdrängung des Phosphats die Bildung energiereicher Phosphatverbindungen und damit die Energieübertragung von der Atmung zu den Syntheseprozessen stört, ist das Arsenat. Es kann als das universellste Phosphorylierungsgift betrachtet werden (vgl. JAMES).

Ganz andere Wirkungsweise dürfte Trypaflavin haben. Man nimmt allgemein an, daß es mit den Nucleinsäuren Salze bildet und diese dadurch ihrer normalen biologischen Wirksamkeit entzieht (vgl. STICH, 1951). Es könnte demnach der Penicillinwirkung, die vielleicht auch an der RNS ansetzt, am nächsten kommen.

In Vorversuchen wurde zunächst die Konzentration ermittelt, die den Zuwachs von *P. vulgaris* in ähnlichem Umfang hemmt wie die benutzten niederen Penicillinkonzentrationen. Für Arsenat war dies bei  $m/5000$ , für MJ bei  $1,5 \cdot 10^{-3}$  m der Fall. Die Hemmung der Sauerstoffaufnahme betrug bei diesen Konzentrationen im Falle von Arsenat rund 50%, bei MJ aber nur 20%. Trypaflavin bildet in höheren Konzentrationen, die entsprechend starke Wachstumshemmungen liefern, einen Niederschlag mit den Nährbodenkomponenten, der auch nach Weglassen von Serum nicht ganz ausblieb. Da diese Niederschläge mit in das zu analysierende Sediment eingehen würden, konnten diese hohen Konzentrationen für unsere Versuche nicht verwendet werden. Es wurde daher mit der stärksten Konzentration, die gerade keine Niederschlagsbildung mehr hervorrief, gearbeitet. Sie betrug  $3 \cdot 10^{-5}$  m und verursachte keine Atmungshemmung. Diese trat erst bei Konzentrationen, die eine Zehnerpotenz höher lagen, ein.

#### a) Die Wirkung von Monojodessigsäure

Bei Zugabe von  $1,5 \cdot 10^{-3}$  m zu einer  $\frac{1}{2}$ stündigen Kultur tritt eine allgemeine Wachstumshemmung ein, die NS und Eiweiß etwa im gleichen Umfang betreffen. Nach  $6\frac{1}{2}$  Std beträgt die Eiweißzunahme nur rund  $\frac{1}{3}$



von der der Kontrolle. Die Hemmung der DNS ist etwas stärker, die der RNS geringfügig schwächer. Dadurch ergibt sich eine leichte Senkung des Quotienten DNS/Eiweiß-N und eine schwache Erhöhung für RNS/Eiweiß-N. Der Quotient RNS/DNS fällt dementsprechend langsamer ab als normal. Die mikroskopische Kontrolle zeigte, daß im Laufe einiger

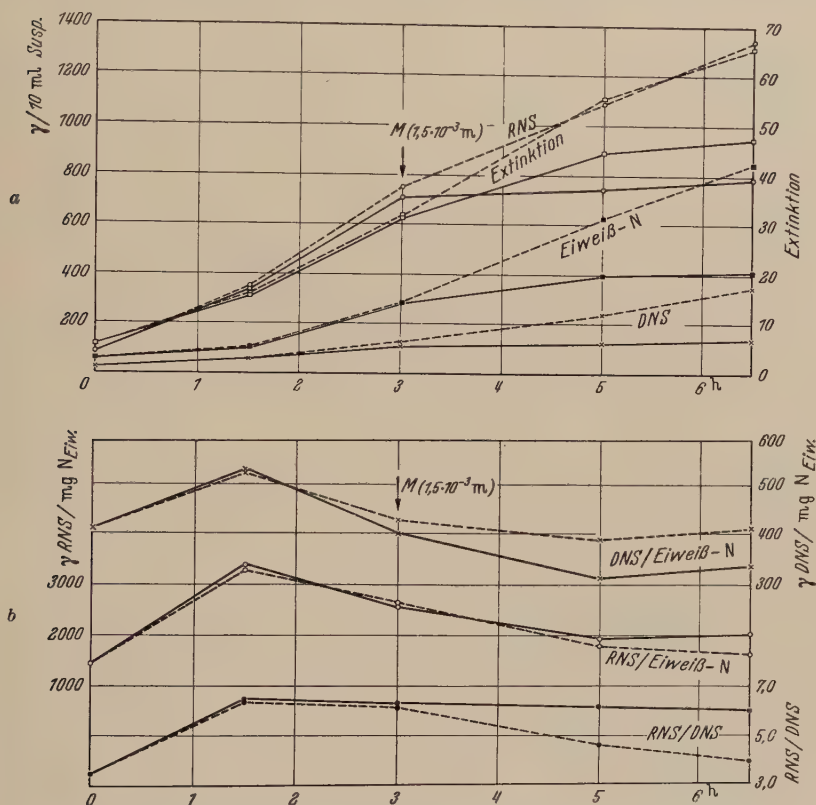


Abb. 6a u. b. Entsprechende Darstellung und Signatur wie in Abb. 4a und b aber bei Zugabe von Monojodessigsäure, 3 Std nach Beimpfung der Nährlösung

Stunden nach der MJ-Zugabe einige ähnliche Winkelformen und später auch Blasen entstanden wie unter Penicillineinfluß. Allerdings war die Zahl relativ gering und bei Ausstrichen von *P. vulgaris* auf MJ-haltige Agarplatten konnten niemals L-Phasenkolonien beobachtet werden.

Bei Zugabe der gleichen MJ-Konzentration am Ende der log-Phase ist die Hemmwirkung und auch die Veränderung der Quotienten stärker. Wie Abb. 6a und b zeigen, wird der weitere Zuwachs an NS vollständig gehemmt und nur noch der Eiweiß-N weist eine leichte Zunahme auf. Damit bleibt der zum Zeitpunkt der Zugabe relativ hohe Wert für

RNS/DNS noch längere Zeit erhalten. DNS/Eiweiß-N fällt entsprechend stärker ab als bei der Kontrolle, während sich die Verhältnisse für RNS/Eiweiß-N gleichsinnig ändern. Vergleicht man die Wirkung der MJ auf den NS-Gehalt von *P. vulgaris* mit der von Penicillin, so ergibt sich zweifellos ein deutlicher Unterschied.

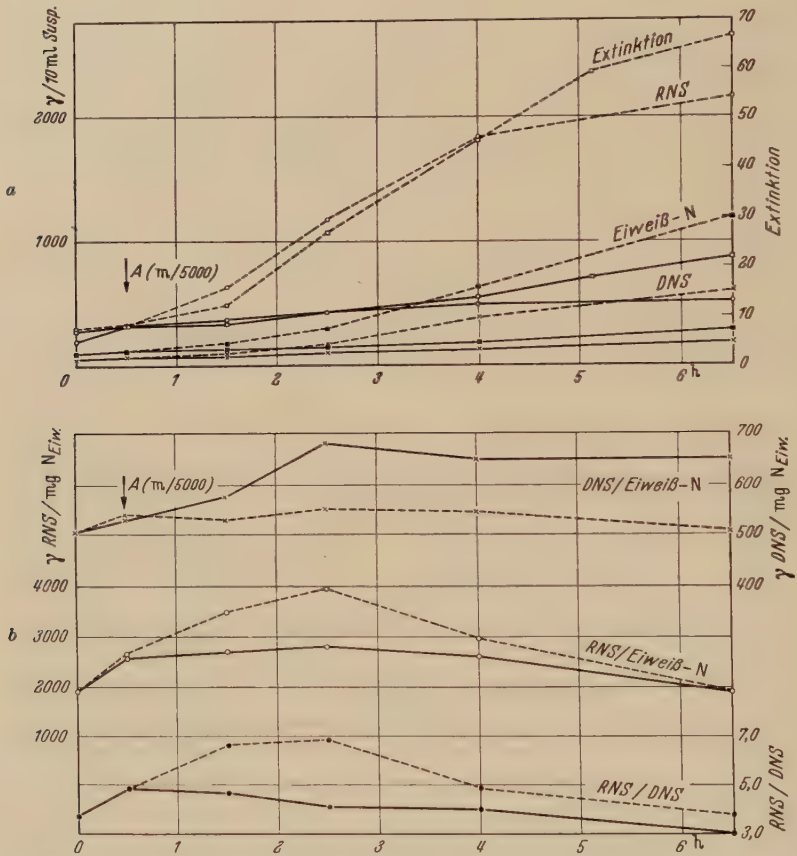


Abb. 7a u. b. Entsprechende Darstellung und Signatur wie Abb. 4a und b. Zugabe von Arsenat zu einer 30 min alten Kultur

### b) Die Wirkung von Arsenat

m/5000 Arsenat hemmt das Wachstum fast vollständig, wenn es am Ende der lag-Phase, 30 min nach der Beimpfung zugesetzt wird (Abb. 7a und b). Am stärksten wird dabei die RNS-Synthese betroffen. Eiweiß und DNS weisen noch eine leichte Zunahme auf. Dementsprechend erreicht der Quotient DNS/Eiweiß-N einen sehr hohen Wert, während der normale Anstieg von RNS/Eiweiß-N völlig ausbleibt. RNS/DNS fällt sehr

rasch ab. Die Zellen werden wesentlich kleiner als normal und erscheinen im Phako besonders kontrastreich. Deformationen waren nicht zu erkennen.

Auch bei der Zugabe am Ende der log-Phase (3 Std nach Einimpfung) war die gleiche starke Hemmwirkung zu beobachten. In den Quotienten

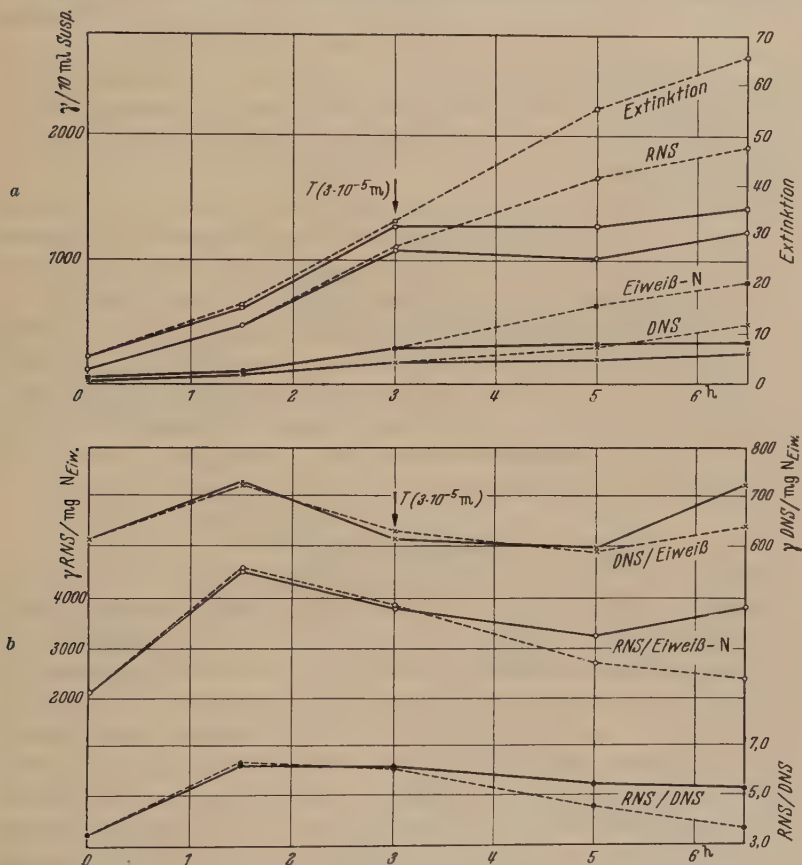


Abb. 8a u. b. Entsprechende Darstellung und Signatur wie in Abb. 4a und b. Zugabe von Tryptophan zu 3 Std alten Kulturen

ergaben sich aber keine deutlichen Veränderungen, da zu diesem Zeitpunkt RNS/Eiweiß-N und RNS/DNS auch bei der Kontrolle abfallen, so daß sich gegenüber der vergifteten Probe nur kleinere quantitative Unterschiede ergeben. Der Quotient DNS/Eiweiß-N wies zwar keinen Anstieg, wohl aber einen verzögerten Abfall auf. Alle Versuche mit Arsenat zeigten, daß durch dieses Gift am stärksten die RNS-Synthese, an 2. Stelle die Eiweiß-Synthese und am geringsten die DNS-Synthese betroffen wird.



### c) Die Wirkung von Trypaflavin

Bei früher Zugabe von  $3 \cdot 10^{-5}$  m Trypaflavin (30 min nach Beimpfung) wird nur eine schwache Wachstumshemmung, die alle untersuchten Faktoren in etwa gleichem Umfang betrifft, bewirkt. Der Quotient RNS/DNS wird etwas erhöht, was auf eine stärkere Hemmung der DNS-Synthese hinweist. Wesentlich kräftiger ist die Wirkung der gleichen Konzentration bei Zugabe nach 3 Std. Abb. 8a und b zeigen, daß der Zuwachs in allen Fraktionen fast vollständig gehemmt wird. Es kommt demnach nur zu einer Verhinderung der normalen Verschiebungen im Verhältnis RNS/Eiweiß-N und RNS/DNS, so daß die ursprünglich hohen Werte erhalten bleiben.

Die morphologische Untersuchung ergab, daß besonders bei der frühen Zugabe ähnliche Teilungshemmungen auftreten, wie sie für schwache Penicillinkonzentrationen beschrieben wurden. Allerdings führt die weitere Entwicklung nicht zur Bildung von large bodies, sondern die Zellen werden transparent, wie in normalen Kulturen in der späten stationären Phase. Innerhalb der stark aufgehellten Zelle sind im Phako 2 sehr kontrastreiche Grana zu sehen, die aber vermutlich nichts mit den Nucleoiden zu tun haben, sondern ähnlich wie bei alternden Zellen verdichtete Plasmaresten darstellen dürften. Eine Lyse von Bakterien war bei den verwendeten geringen Konzentrationen nicht zu beobachten.

### Diskussion der Ergebnisse

Die bisherigen Untersuchungen über das Verhalten der Kernsubstanzen während der Bildung von large bodies (SCHELLENBERG, 1955). KELLENBERGER u. LIEBERMEISTER (1956) haben gezeigt, daß mit der Aufblähung der Zellen eine starke Vermehrung der feulgenpositiven bzw. mit HCl-Giemsa färbbaren Körperchen erfolgt. Da die large bodies im Phako im allgemeinen recht kontrastarm werden und stark vakuolisieren, lag die Vermutung nahe, daß unter dem Einfluß des Penicillins die Vermehrung der Kernsubstanz fortgesetzt, die Komponenten des Plasmas — Eiweiß und RNS — aber stark gehemmt werden. Insbesondere die Ausbildung der Membran scheint stark zurückzutreten. Die Untersuchung der stofflichen Zusammensetzung, wie sie in vorliegender Arbeit vorgenommen wurde, ergab tatsächlich für Suspensionen mehr oder weniger weit fortgeschrittener Umwandlungsstadien Veränderungen, die in der vermuteten Richtung liegen: Verschiebung des Quotienten RNS/DNS zugunsten von DNS und Erhöhung des Wertes für DNS/Eiweiß. Ähnliche Verhältnisse fanden auch RIPPEL u. BUSCH (1954) für die durch andere Einflüsse hervorgerufenen Involutionsformen verschiedener Bakterien.

Betrachtet man nicht nur die Endzustände sondern den gesamten Entwicklungsablauf, so ergibt sich keine so günstige Übereinstimmung mit den morphologischen Befunden. Vom Zeitpunkt der Penicillinzugabe an

erfolgt nämlich keine entsprechend starke DNS-Vermehrung mehr, wie man sie erwarten müßte, wenn tatsächlich die Nucleoide wesentlich vermehrt würden. Die absolute Zunahme je Suspensionseinheit ist nur sehr gering und die Verschiebung der Quotienten ergibt sich nur aus der praktisch vollkommenen Hemmung der RNS und der Eiweißzunahme.

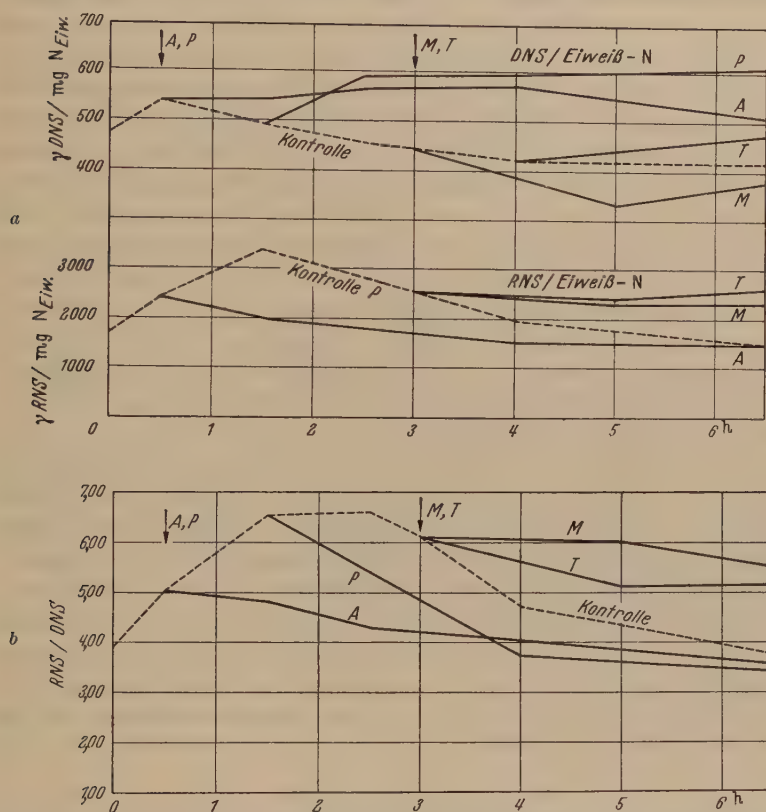


Abb. 9a u. b. Zusammenfassende Darstellung der Wirkung von Penicillin, Arsenat, Monojodessigsäure und Trypaflavin auf die verschiedenen Quotienten bei Zugabe nach 30 min bzw. 3 Std

Demnach müßte man zu der Vorstellung gelangen, daß tatsächlich keine Vermehrung der Kernsubstanz, sondern nur eine Aufteilung derselben in mehrere distinkt färbbare Grana erfolgt. Es ist aber sehr schwer vorstellbar, daß trotz dieses „Zerfalles“ der Kernsubstanz die Funktionstüchtigkeit erhalten bleiben soll. Zu einer Lösung dieses Paradoxons — starke Vermehrung der Nucleoide einerseits, nur sehr geringe Zunahme der DNS andererseits — kann vielleicht die Berücksichtigung der Zahlenverhältnisse bei der Umwandlung in die L-Phase beitragen.

LIEBERMEISTER (1953) sowie KELLENBERGER u. LIEBERMEISTER (1956) hatten bei ihren Versuchen gefunden, daß maximal 10% der Keime zur Bildung von L-Kolonien befähigt sind, während wir in eigenen Versuchen (KANDLER u. KANDLER, 1956) nur eine Ausbeute von 0,1—1% erhielten. Demnach ist offenbar nur ein geringer Teil der entstehenden large bodies zur Weitervermehrung fähig. Es ist daher leicht vorstellbar, daß gerade die in den gefärbten Präparaten überwiegend auftretenden Formen mit zahlreichen „Nucleoiden“ tatsächlich nicht mehr vermehrungsfähig sind und lediglich Involutionsformen im üblichen Sinne darstellen. Es wird erst noch eingehender quantitativer Auswertung gefärbter Präparate bedürfen, um mit Sicherheit angeben zu können, wie die Kernverhältnisse bei den tatsächlich zu L-Kolonien auswachsenden Organismen sind. Die bisherigen Untersuchungen über die stofflichen Veränderungen nach Penicillinzugabe sprechen jedenfalls nicht dafür, daß ganz generell eine wesentliche Vermehrung der Kernsubstanz eintritt. Da es sich aber bisher um erste Versuche zur Erfassung dieser Vorgänge handelt, kann natürlich noch kein abschließendes Urteil abgegeben werden. Es wird weiterhin wichtig sein, sich um die weitere Koordinierung von morphologisch-cytologischen und stoffwechselphysiologischen Untersuchungen der L-Phasen-Umwandlung zu bemühen.

Die in vorliegender Arbeit erfaßten Veränderungen in der stofflichen Zusammensetzung der durch Penicillin gehemmten Bakterien unterscheiden sich deutlich von den Veränderungen, die durch andere Gifte hervorgerufen werden. Um den Vergleich besser durchführen zu können, wurden in den Abb. 9a und b die verschiedenen Kurven für die unvergiftete Kontrolle in eine Idealkurve zusammengefaßt und die durch die verschiedenen Zusätze bewirkten Abweichungen nach entsprechender Umrechnung eingetragen. Je nachdem, ob sich die stärksten Abweichungen bei der frühen oder späten Zugabe ergeben, wurden die Kurven für die erstere oder letztere verwendet.

### Zusammenfassung

Suspensionen von *Proteus vulgaris* wurden in verschiedenen Entwicklungszuständen mit Penicillin versetzt und parallel zur einsetzenden Umwandlung in die Frühstadien der L-Phase (large bodies) wurde der Gehalt an RNS, DNS und Eiweiß-N bestimmt. Durch Verwendung geringer Konzentrationen (4—7 IE/ml) konnte auch in der log-Phase die Umwandlung so schonend geführt werden, daß keine Lysen eintraten.

Die Atmungsmessungen zeigten, daß unter Bedingungen, unter denen sich alle Bakterien umwandeln, keine Veränderung des Sauerstoffverbrauches eintritt. Die Hemmung der Sauerstoffaufnahme bei Zugabe hoher Konzentrationen zur log-Phase beruht auf der Lyse eines großen Teiles der Zellen. Mit der Umwandlung in die large bodies ist eine Ver-



schiebung des Quotienten RNS/DNS zugunsten von DNS und eine Erhöhung der Werte für DNS/Eiweiß-N verbunden. Dies beruht aber nicht auf einer Steigerung der DNS-Synthese, sondern nur auf der etwas schwächeren Hemmung derselben gegenüber dem Aufbau von RNS und Eiweiß. Es ergeben sich keine Anzeichen für die auf Grund morphologischer Versuche vermutete Vermehrung des Kernmaterials. Es kann sich demnach nur um eine Aufteilung des vorhandenen Materials handeln.

Untersuchungen über die entsprechenden Wirkungen von Arsenat, Monojodessigsäure und Trypaflavin auf die Stoffzusammensetzung von *P. vulgaris* zeigten, daß es sich bei der erfaßten Penicillinwirkung nicht nur um eine unspezifische Folge einer allgemeinen Stoffwechselhemmung handelt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

### Literatur

- DIENES, L.: J. Bacter. **57**, 529 (1949). — EAGLE, H., and A. K. SAZ: Annual Rev. Microbiol. **9**, 173 (1955). — HÖPKEN, W., u. K. BARTMANN: Zbl. Bakter. I Orig. **162**, 372 (1955). — JAMES, W. O.: Annual Rev. Plant Physiol. **4**, 59 (1953). — KANDLER, G., u. O. KANDLER: Arch. Mikrobiol. **21**, 178 (1954). — KANDLER, O., u. G. KANDLER: Z. Naturforsch. (im Druck 1956). — KANDLER, O., C. ZEHENDER u. J. MÜLLER: Arch. Mikrobiol. (im Druck 1956). — KELLENBERGER, E., u. K. LIEBERMEISTER: Z. Naturforsch. (im Druck 1956). — LIEBERMEISTER, K.: Zbl. Bakter. I Orig. **160**, 250 (1953). — Zbl. Bakter. I. Ref. **156**, 180 (1955). — SCHELLENBERG, H.: Zbl. Bakter. I Orig. **161**, 433 (1954). — STICH, H.: Naturwissenschaften **38**, 435 (1951). — RIPPEL-BALDES, A., u. G. BUSCH: Nachr. Akad. Wiss. Göttingen, Math.-physik. Kl. IIb, **1954**, 23.

(Station agronomique et oenologique de Bordeaux)

## Sur les *Brettanomyces* isolés de Raisins et de Vins

par

E. PEYNAUD et S. DOMERCQ

Avec 14 figures dans le texte

(Eingegangen am 10. Januar 1956)

La présence dans les moûts de raisin en fermentation et dans les vins de levures du genre *Brettanomyces* a été signalée à plusieurs reprises, mais parfois à tort. LODDER et KREGER-VAN RIJ ont montré par exemple que les levures dénommées *Brettanomyces italicus* par VERONA et FLORENZANO appartenaient en réalité à l'espèce *Torulopsis bacillaris*. Cependant dès 1933, KRUMBHOLZ et TAUSCHANOFF isolèrent d'un moût de raisin français une levure désignée *Mycotorula intermedia* qui appartient en fait à l'espèce *Brettanomyces bruxellensis*.

On connaît la définition du genre *Brettanomyces* van Laer et Denamur: «ces levures sont asporogènes, de forme ronde ou ovale, souvent ogivale; elles ne donnent pas de mycélium, mais un pseudomycélium; elles se reproduisent par bourgeonnement multilatéral; leur croissance est lente, elles donnent une abondante formation d'acides à partir des sucres et produisent un arôme typique; elles possèdent un métabolisme oxydatif et fermentatif.»

D'après des observations récentes, la participation des *Brettanomyces*, d'ailleurs peu souhaitable, à la vinification et aux refermentations, est dans quelques cas absolument certaine.

SCHANDERL a rencontré plusieurs fois de telles levures dans des vins mousseux, AGOSTINI dans un voile d'un vin acétifié. Récemment, BARRET, BIDAN et ANDRE au cours d'isolements sur des vins jaunes du Jura altérés, ont trouvé des levures appartenant au genre *Brettanomyces* et ont montré que la mauvaise réussite de l'élaboration de ces vins était souvent imputable au développement d'un voile de ces levures. Ces auteurs en décrivent cinq souches, quatre issues de vins d'Arbois, une autre d'un vin du Maconnais. Elles sont proches du type *Brettanomyces bruxellensis* Kufferath et van Laer; elles en diffèrent cependant par certains caractères fermentatifs et par leur origine, la plupart des *Brettanomyces* ayant été, jusqu'à maintenant, isolés de la bière. Les auteurs en font donc une nouvelle variété qu'ils appellent *Brettanomyces bruxellensis*, variété *vini*.

SIMONE DOMERCQ dans son étude des levures des moûts et des vins de la Gironde a obtenu 4 souches de *Brettanomyces* à partir de deux moûts de raisins rouges sur 95 étudiés. L'un provenait de Quinsac, à 20 km au sud-est de Bordeaux, l'autre de Saint-Emilion à 40 km à l'est. L'isolement a été fait à la fin de la fermentation. Voici la description que Mlle DOMERCQ donne de ces levures:

«Caractères morphologiques. — Sur moût de raisin, au bout de 3 jours, le liquide est très légèrement trouble, les cellules sont elliptiques, un peu allongées, présentant la forme ogivale caractéristique, de dimensions (5—6) · 3  $\mu$  ou

(5—8) · 3  $\mu$  suivant les souches. Au bout de 6 jours, le liquide est trouble, un dépôt est formé au fond du tube. Les cellules sont un peu plus grosses (5—8) · (3—4)  $\mu$  ou (5—10) · 3  $\mu$ . Au bout de 30 jours, les cellules ont un aspect à peu près identique, elles sont isolées ou groupées par deux ou en petites chaînes ayant jusqu'à 5 éléments. Le liquide est limpide; des dépôts sont formés sur le fond et les parois du tube. Une souche forme un anneau important. (D'autres donnent des voiles plus ou moins abondants.)»

«Sur moût de bière l'aspect des cellules au cours du développement est sensiblement le même. D'une façon générale, elles sont un peu plus arrondies (5—8) · (3—6)  $\mu$  ou (6—10) · (3—5)  $\mu$ . Entre le troisième et le sixième jour, on note l'apparition de globules ronds dans les cellules. On observe au bout de trois jours un léger voile mat, puis la formation incomplète d'un anneau blanc ou beige au-dessus du liquide, qui devient peu à peu limpide.

Sur moût de bière gélósé, au bout de 4 jours, la culture blanche, brillante, est formée de cellules elliptiques allongées (4—7) · (2—4)  $\mu$  et de cellules très longues 12 · 4 ou même 20 · 3  $\mu$ . Au bout de 7 jours, les cellules elliptiques contiennent un granule et les longues cellules forment des chaînes ramifiées. Au bout de 31 jours, les cellules sont plutôt grosses (4—12) · (3—7) avec la majorité des cellules de dimensions (5—8) · (3—7)  $\mu$ .

Sur milieu de Gorodkowa, les cellules sont en moyenne plus petites que sur les milieux précédents. Les cultures sont minces, blanches, formées de colonies juxtaposées. Nous n'avons pas observé de spores.

Colonies géantes: sur moût de raisin gélatiné, colonies beiges, petites, rondes, mates; le centre est plat ou légèrement creusé, la bordure finement rayonnée et festonnée. Sur moût de bière gélósé, colonies blanches, brillantes, amorphes. Sur moût de raisin gélósé: colonies blanches ou beige rosé, rondes, sans festons, également amorphes et brillantes.

Liquéfaction de la gélatine: les deux souches, cultivées en boîte de Pétri sur moût gélatiné, liquéfient la gélatine avec des vitesses différentes.»

Ces levures se caractérisent en outre par une multiplication et une fermentation très lentes. La période d'incubation après ensemencement est de plusieurs jours; la fermentation peut durer deux mois.

Nous avons soumis les souches isolées à Mlle CH. SLOOF du Centraal-bureau voor Schimmelcultures de Delft, que nous tenons à remercier ici de sa collaboration, et dont voici les conclusions:

«Ces souches sont à classer dans le genre *Brettanomyces*. Ces deux souches sont à peu près identiques, elles diffèrent par le voile qui manque pour la souche de Saint-Emilion et dans la fermentation du raffinose qui est faible pour toutes les deux, mais plus forte pour la souche de Quinsac (dans l'appareil de Kluyver-van Iterson).

Fermentation et assimilation sont identiques: glucose, galactose, saccharose, maltose et raffinose sont assimilés, ainsi que le nitrate de potassium; la fermentation du glucose est assez forte, le saccharose est fermenté plus lentement, tandis que la fermentation du galactose et du maltose est encore plus lente.

Ce qui est curieux et ne se trouve pas chez les *Brettanomyces* isolés de la bière, c'est que la fermentation du galactose et du maltose est du même degré. Les cellules ovales, exigées pour la diagnose du genre, sont présentes dans la culture en milieu solide. Un pseudomycélium, portant des blastospores en verticilles et des blastoconidies, se trouve dans la culture en lame sur agar à la pomme de terre.

Les souches se rapprochent de *Brettanomyces bruxellensis*, mais elles ne sont pas identiques à cette espèce.»



Dans le présent travail, nous étudions les souches de *Brettanomyces* recueillies en Gironde, comparativement à celles de vins d'Arbois qui ont été isolées et nous ont été adressées par M. BARRET, à qui nous exprimons nos vifs remerciements, et à celles que nous devons à l'amabilité du Professeur H. SCHANDERL, Geisenheim. Ces souches provenant de vins sont

Fig. 1. *Brettanomyces* Arbois 6Fig. 2. *Brettanomyces* Geisenheim 1

Fig. 3.  
*Brettanomyces bruxellensis* Kufferath et Van Laer



Fig. 4. *Brettanomyces clausenii* Custers. Les cellules sont représentées cultivées sur milieu liquide (en haut de chaque figure) et sur milieu solide (en bas). Grossissement 1000

également comparées aux souches suivantes du Centralbureau voor Schimmelcultures de Delft qui nous ont servi de référence:

*Brettanomyces claussenii*  
*Brettanomyces bruxellensis*  
*Brettanomyces lambicus*

Custers  
 Kufferath et Van Laer  
 Kufferath et Van Laer.

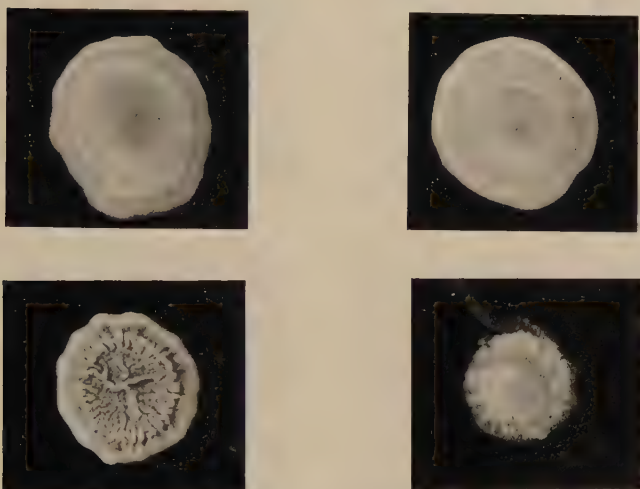


Fig. 5. Colonies géantes de divers *Brettanomyces*. De gauche à droite et de haut en bas; *Brettanomyces vini* Geisenheim sur moût gélosé; *Brettanomyces vini* Arbois sur moût gélosé; *Brettanomyces bruxellensis* sur moût gélosé; *Brettanomyces vini* Quinsac sur moût gélosé.

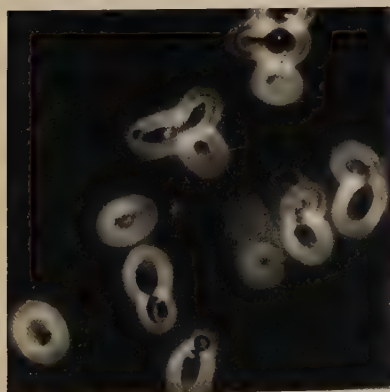
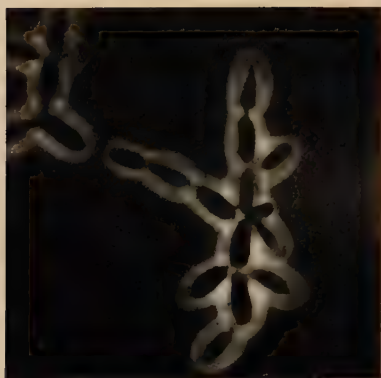


Fig. 6. *Brettanomyces claussenii* (moût de raisin)



Fig. 7. *Brettanomyces claussenii* (malt gélosé)

Après des examens morphologiques très détaillés sur lesquels nous ne reviendrons pas (voir les figures 1—4 et photos 5—13 ci-jointes), notre étude a porté notamment sur les tests de fermentation et d'assimilation

Fig. 8. *Brettanomyces bruxellensis* (moût de raisin)Fig. 9. *Brettanomyces vini* Arbois (moût de raisin)Fig. 10. *Brettanomyces vini* Arbois (malt gélifié)Fig. 11.  
*Brettanomyces vini* Saint-Emilion (malt gélifié)Fig. 12.  
*Brettanomyces vini* Quinsac (malt gélifié)Fig. 13. *Brettanomyces schanderlii* (malt gélifié).  
Photographies prises au microscope à contraste de phase; grossissement 1000 diamètres



des sucres, sur la mesure des intensités respiratoire et fermentatives à l'appareil de WARBURG, sur les pouvoirs alcoogène, acidogène et estéro-gène, sur la formation des produits secondaires, sur les besoins en facteurs de croissance. Pour ces mesures et analyses, nous avons bénéficié de la collaboration de Mlles LAFON et LAFOURCADE et de G. GUIMBERTEAU. Cette documentation nouvelle rassemblée sur ces levures nous permet d'envisager leur classification avec certitude.

### Fermentation et assimilation des différents sucres

Les tests de fermentation sont effectués en triple exemplaire, selon la technique des clochettes de DURHAM, sur milieu à l'eau de levure, en prolongeant les observations durant 15 jours. Les tests d'assimilation sont faits également en triple exemplaire, en tubes à essai, sur milieu synthétique complet au point de vue des sels minéraux et des vitamines; l'azote est fourni sous forme de sels ammoniacaux et d'asparagine; après 15 jours à 25° C, on mesure la croissance par néphélométrie par rapport à un témoin non sucré.

Tableau 1. Tests de fermentation des sucres par différents *Brettanomyces*, technique de Durham, et d'assimilation<sup>1</sup>, d'après mesures néphélométriques de cultures de 15 jours

	Glucose	Galactose	Saccharose	Maltose	Lactose	Raffinose
<i>Brett. bruxellensis</i>	+	—	+	+	—	—
<i>Brett. clausenii</i>	+	+	+	+	+	—
<i>Brett. lambicus</i>	+	—	+	+	—	—
Quinsac . . . . .	+	+	+	+	—	—
Saint-Emilion . .	+	+	+	+	—	—
Arbois 6 . . . . .	+	+	+	+	—	—
Arbois 8 . . . . .	+	+	+	+	—	—
Geisenheim 1 . .	+	+	—	—	—	—
Geisenheim 2 . .	+	+	+	+	—	—

<sup>1</sup> Assimilation en ( ) ; Lactose et Raffinose non examinés

Le tableau 1 reproduit pour les diverses souches étudiées les résultats de ces essais. Nos résultats pour les souches de référence sont en accord avec les indications de LODDER et KREGGER-VAN RIJ d'une part (sauf l'absence de fermentation du raffinose que nous notons pour *Brettanomyces clausenii*) et de BARRET et ses collaborateurs d'autre part (sauf l'absence d'assimilation du galactose par *Brett. bruxellensis*). Nous n'avons pas retrouvé non plus la faible fermentation positive du raffinose notée par Mlle CH. SLOOF; les tubes équipés de clochettes de Durham constituent sans doute un système moins sensible que l'appareil Kluyver-van Iterson, à cause de la solubilité du gaz carbonique surtout lorsque la fermentation est très faible et très lente.

Quoi qu'il en soit, on voit que les *Brettanomyces* isolés du vin se classent en deux catégories bien distinctes: les souches de la Gironde, d'Arbois,

la souche N° 2 de Geisenheim, qui ne font pas fermenter le raffinose et le lactose; la souche N° 1 de Geisenheim qui, en plus, ne fait pas fermenter le saccharose et le maltose. Par ailleurs, ces deux types de levures ne correspondent à aucune des espèces connues et décrites par LODDER et KREGER-VAN RIJ. Le premier groupe se différencie de *Brett. bruxellensis* par la fermentation et l'assimilation du galactose; d'autre part il s'éloigne de *Brett. claussenii*, capable de faire fermenter le lactose. Quant à la souche N° 1 de Geisenheim, elle ne s'accorde aucunement avec la description donnée pour *Brett. anomalus*, dont les cellules sont beaucoup plus allongées et qui fait fermenter le lactose.

Ces tests de base suffisent donc à eux seuls à démontrer que nous sommes en présence de levures nouvelles.

### Assimilation azotée, utilisation de l'éthanol, formation d'un voile

Le tableau 2 rassemble ces données.

LODDER et KREGER-VAN RIJ indiquent une réaction positive pour l'utilisation des nitrates par *Brett. bruxellensis*; elle est estimée faible par BARRET et ses collaborateurs; nous l'avons jugée pratiquement négative, tandis que les autres souches (sauf la souche de Geisenheim N° 1) montrent une réaction positive très nette.

Tableau 2. Assimilation azotée et quelques autres caractères de différents *Brettanomyces*

	Sels ammoniacaux	Nitrate de potassium	Utilisation de l'éthanol	Voile sur moût de raisin
<i>Brett. bruxellensis</i> .	+	—	—	Îlots, anneau
<i>Brett. claussenii</i> . .	+	+	+ faible	Anneau
<i>Brett. lambicus</i> . .	+	+	—	Léger voile
Quinsac . . . . .	+	+	—	Très léger voile
Saint-Emilion . .	+	+	—	Anneau
Arbois 6 . . . . .	+	+	—	Léger voile
Arbois 8 . . . . .	+	+	—	Léger voile
Geisenheim 1 . . .	+	—	—	Pas de voile
Geisenheim 2 . . .	+	+	—	Voile partiel

La croissance sur éthanol n'a été vraiment positive que pour *Brett. claussenii*.

Enfin on distingue tous les intermédiaires (anneaux sur la paroi, voile partiel, îlots) entre les souches formant un voile uniforme à la surface du moût de raisin en fermentation et celles qui n'en forment pas. Ce caractère, qui dépend aussi de la nature du milieu de culture, ne permet donc pas de classer les espèces d'une manière absolue.

### Intensités respiratoires et fermentatives

Nous reproduisons dans le tableau 3 les résultats de quelques mesures effectuées avec l'appareil de WARBURG. On opère comparativement avec les cellules de cultures semi-aérobies d'une dizaine de jours, ensemencées dans un même milieu synthétique complet.

L'intensité respiratoire est faible et partout du même ordre. En raison du caractère adaptatif du ferment respiratoire, ces valeurs sont simplement comparatives. Dans la première phase de la fermentation, tant que le milieu est réducteur et dépourvu d'oxygène libre, l'intensité respiratoire des levures est toujours très faible. Elle augmente vers la fin de la fermentation avec la pénétration d'oxygène.

Tableau 3. *Intensités respiratoires et fermentatives de différents Brettanomyces*  
(mm<sup>3</sup> de gaz absorbé ou dégagé par mg de levure et par heure)

	Q <sub>O<sub>2</sub></sub>	Q <sub>CO<sub>2</sub></sub>	Q $\frac{CO_2}{CO_2}$
<i>Brett. bruxellensis</i> . . . . .	1,6	53	54
<i>Brett. clausenii</i> . . . . .	0,7	54	38
<i>Brett. lambicus</i> . . . . .	0,6	45	55
Quinsac . . . . .	2,6	31	52
Arbois 6 . . . . .	1,8	30	37
Geisenheim 1 . . . . .	2,7	37	37
Geisenheim 2 . . . . .	2,5	42	47

Les intensités fermentatives, assez peu différentes d'une levure à l'autre, sont faibles. Les *Brettanomyces* font fermenter les sucres 4 à 5 fois plus lentement que les *Saccharomyces*. La fermentation anaérobie est à peine plus forte que la fermentation aérobie. Tous les *Brettanomyces* sont remarquablement comparables en ce qui concerne l'intensité de leur métabolisme, et ces mesures ne permettent pas de différencier les diverses espèces.

### Pouvoirs alcoogène, acétogène et estérigène

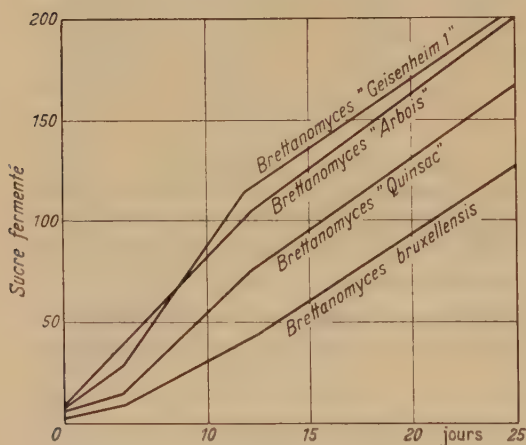
Les *Brettanomyces* sont des levures de fermentation très lente, mais bonnes productrices d'alcool puisqu'elles peuvent atteindre 13°1 (en volume) dans des fermentations suffisamment aérées et 12°0 en anaérobiose ménagée. Dans des conditions strictes d'abri de l'air, comportant l'ensemencement d'un moût privé d'air et la fermentation sous barbotage dans le mercure du gaz carbonique dégagé, la fermentation s'arrête avant 8°0 d'alcool (voir tableau 4). On remarque que les degrés obtenus avec les *Brettanomyces* provenant de vins sont nettement plus élevés que ceux des souches isolées de la bière (voir courbes de fermentation, fig. 14).



Tableau 4. *Pouvoirs alcoogène, acétogène et estérogène de différents Brettanomyces. Fermentation sur moût de raisin*

	Degré alcoolique		Acide acétique Mg par l.		Acétate d'éthyle Mg par l	
	Air	Abri de l'air	Air	Abri de l'air	Air	Abri de l'air
<i>Brett. bruxellensis</i> . . .	—	9°7	31,0	13,0	66	44
<i>Brett. clausenii</i> . . .	—	9°9	28,7	6,9	176	9
<i>Brett. lambicus</i> . . .	—	10°5	72,2	14,8	59	13
Quinsac. . . . .	13°1	11°6	23,0	10,0	176	31
Saint-Emilion . . . .	13°1	11°6	10,6	8,7	15	9
Arbois 6 . . . . .	—	11°1	58,1	10,6	66	29
Arbois 8 . . . . .	—	11°6	58,1	10,6	99	17
Geisenheim 1 . . . .	—	11°9	22,4	11,2	143	20
Geisenheim 2 . . . .	—	12°1	58,7	10,6	121	13

D'une manière générale, dans des fermentations suffisamment prolongées, les *Brettanomyces* forment beaucoup d'acide acétique, notamment au contact de l'air. Quelques souches sont moins acétogènes, quelles que soient les conditions de fermentation, en particulier les souches de *Brett.*

Fig. 14. Courbes de fermentation d'un moût de raisin par divers *Brettanomyces*

*bruxellensis* et *Brett. clausenii* et celles provenant des vins de Saint-Emilion et de Geisenheim 1. Les levures à voile sont les plus acétogènes. Enfin les propriétés estérogènes des *Brettanomyces* sont assez variables. La quantité d'acétate d'éthyle formée peut être ou très faible (souche de Saint-Emilion), ou suffisamment élevée pour être perçue à l'odorat. La production de cet ester est liée à la respiration : basse à l'abri

de l'air, elle est maximum dans les conditions d'aérobiose. Elle ne paraît pas en relation avec l'aptitude à former un voile superficiel.

### Formation des produits secondaires

Le tableau 5 donne, sous forme de bilans, le taux des produits secondaires pour les diverses souches de *Brettanomyces*, faisant fermenter un même moût de raisin. On a conduit les fermentations dans deux conditions : au contact ménagé de l'air, dans des récipients aux trois-quarts

Tableau 5. Formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique par différents Brettanomyces.  
Fermentation d'un moût de raisin. Les chiffres sont des millimolécules par litre

	Alcool	Glycérol.	Acide acétique	Acide succinique	2,3-butanediol	Éthanol	$\Sigma$	$\Sigma/g$	Acide lactique.
<i>Brett. bruxellensis</i> . . . . .	10° 1	64	31,2	9,4	2,0	0,9	112	1,75	3,0
	6° 6	57	13,0	5,3	1,3	0,2	53	0,94	—
<i>Brett. clausenii</i> . . . . .	10° 4	55	28,7	9,9	2,2	0,4	109	1,98	2,2
	6° 4	54	6,9	6,0	1,4	0,2	45	0,83	—
<i>Brett. lambicus</i> . . . . .	9° 9	51	72,2	9,4	4,8	0,5	197	3,87	3,0
	7° 1	59	14,8	6,0	1,8	0,2	62	1,04	—
Quinsac . . . . .	10° 2	55	23,0	8,2	1,9	1,0	90	1,64	4,5
	8° 5	49	10,0	6,0	1,4	0,4	52	1,06	—
Saint-Emilion . . . . .	10° 6	60	10,6	8,2	1,6	0,7	64	1,06	4,5
	8° 7	53	8,7	6,2	1,4	0,2	50	0,94	—
Arbois 6 . . . . .	10° 4	60	58,1	9,4	2,1	1,1	166	2,86	4,5
	7° 5	57	10,6	6,2	1,3	0,2	54	0,95	—
Arbois 8 . . . . .	10° 7	61	58,1	9,9	2,1	1,0	169	2,90	4,5
	7° 8	56	10,6	6,2	1,3	0,2	54	0,96	—
19* Geisenheim 1 . . . . .	10° 4	62	22,4	9,0	2,8	0,8	93	1,49	5,7
	8° 1	53	11,2	5,8	1,4	0,2	53	1,00	—
Geisenheim 2 . . . . .	10° 7	62	58,7	8,2	2,2	0,9	161	2,60	2,2
	7° 8	53	10,6	6,4	1,2	0,2	55	1,03	—

pleins, simplement obturés d'un tampon d'ouate, et en anaérobiose stricte dans des flacons à barboteur de mercure.

L'expression sous forme de bilans repose sur le fait que les produits secondaires formés par la levure à partir du sucre dérivent de la fermentation glycéropyruvique de NEUBERG. Il a été démontré que les acides acétique et succinique, ainsi que le 2,3-butanediol proviennent de la dismutation et de la condensation de l'acide pyruvique décarboxylé libéré par cette fermentation. Ces trois corps, auxquels on peut joindre la petite quantité d'éthanol qui reste toujours à la fin de la fermentation représentent donc quantitativement la contre-partie du glycérol. Cette théorie a été développée dans un grand nombre de publications (GENEVOIS et coll., PEYNAUD et coll.). Les analyses effectuées jusqu'à maintenant sur plusieurs centaines de milieux fermentés ont abouti à la relation suivante, dans laquelle  $g$  est le glycérol,  $a$  l'acide acétique,  $s$  l'acide succinique,  $h$  l'éthanol et  $b$  le 2,3-butanediol:

$$2a + 5s + h + b = \Sigma = 0,9 \text{ à } 1 g.$$

Bien entendu, lorsque les levures sont capables de former des sous-produits par voie oxydative et lorsqu'elles travaillent au contact de l'air, cette relation ne se vérifie plus. La technique des bilans de fermentation permet précisément de distinguer dans la fermentation au contact de l'air les levures uniquement fermentatives pour lesquelles ces bilans sont corrects, de celles qui donnent naissance à de l'acide acétique, de l'éthanol et éventuellement de l'acide succinique par oxydation de l'alcool. Bien entendu encore, les levures oxydatives placées en anaérobiose parfaite donnent des bilans corrects.

C'est ainsi qu'on observe avec les *Brettanomyces* étudiés que  $\Sigma/g$  varie de 0,83 à 1,06 en l'absence d'oxygène, ce qui vérifie la relation ci-dessus, tandis qu'à l'air ce rapport est très élevé.

La formation de glycérol est le plus souvent plus forte à l'air. Elle est pour toutes ces levures du même ordre de grandeur, mais nettement moins abondante, à quantité égale de sucre fermenté, que pour les *Saccharomyces*. Nous ne reviendrons pas sur les taux d'acide acétique, sinon pour constater qu'il est le seul produit secondaire sensiblement variable d'une espèce à une autre. Le caractère acidogène de ces levures ressort encore de la production relativement élevée d'acide succinique, tandis que le 2, 3-butanediol reste à des concentrations très basses.

Par ailleurs, la formation d'acide lactique ne dépasse pas les taux habituellement constatés avec des *Saccharomyces*.

### Besoins en facteurs de croissance

Le genre *Brettanomyces* est remarquablement homogène lorsqu'on considère les besoins en facteurs de croissance, toutes les espèces étudiées ont un comportement très voisin. Le tableau 6 reproduit à titre d'exemple la réponse de *Brett. bruxellensis* à diverses carences vitaminiques.

Tous les *Brettanomyces* sont auxo-autotrophes, en ce sens qu'on note toujours une croissance en l'absence complète de toute vitamine et qu'on



peut repiquer indéfiniment ces levures en milieu minéral sans vitamine. Mais dans ces conditions, la multiplication est très réduite et l'adjonction individuelle de tous ces facteurs, sans exception, exerce une action favorisante sur la croissance et la fermentation.

L'action de la thiamine est la plus importante; en milieu carencé en thiamine, la population levurienne finale reste à peine le dixième de la

Tableau 6. *Besoins en facteurs de croissance de Brettanomyces bruxellensis*

	Croissance des levures	Sucre fermenté (g/l)		
	Nombre de levures par mm <sup>3</sup>	15 jours	23 jours	33 jours
Sans vitamine . . . . .	8000	10	18	27
Avec toutes les vitamines . . .	88000	74	100	—
Sans biotine . . . . .	32000	12	18	18
Sans pyridoxine . . . . .	64000	33	82	100
Sans thiamine . . . . .	8000	12	20	30
Sans thiamine-pyridoxine . . .	8000	8	13	15
Sans acide pantothénique . . .	80000	43	92	100
Sans mésoinositol . . . . .	78000	11	39	99
Sans acide nicotinique . . . .	64000	18	47	85
Sans acide p. aminobenzoïque.	80000	35	91	100

population normale et la transformation du sucre est extrêmement lente. Vient ensuite la biotine dont l'absence retarde beaucoup plus la fermentation du sucre que la multiplication des levures, contrairement à ce qui se passe avec les *Saccharomyces*, par exemple. Parfois le manque de mésoinositol exerce une influence retardatrice plus ou moins marquée. L'acide nicotinique et la pyridoxine se montrent plus nécessaires que l'acide pantothénique.

### Caractères organoleptiques

Les cultures de *Brettanomyces* sur moût de raisin présentent à l'odeur des caractères spéciaux assez typiques, que nous avons essayé d'analyser dans le tableau 7. Nous distinguons une odeur sure et aigre, désagréable, différente de l'odeur pénétrante d'acétate d'éthyle et plus complexe. La plupart des cultures ont une odeur fruitée, aldéhydique, rappelant la pomme; certaines possèdent un caractère particulier, butyrique par exemple. Mais toutes ont une odeur plus ou moins intense et toujours infecte, qui rappelle l'acétamide. Cette odeur, assez difficile à définir par un autre terme qu'odeur «de souris», se perçoit à la fin de la dégustation et semble être due à des produits peu volatils. Elle est exaltée surtout, et c'est de cette façon qu'on la distingue le plus aisément, lorsqu'on se mouille les doigts avec le liquide et qu'on les sent après un certain temps d'évaporation.

Cet arrière-goût d'acétamide a été rencontré parfois dans certains vins, mal vinifiés ou mal conservés, offrant généralement des bactéries à l'examen microscopique. Il peut provenir de l'attaque des protéines et d'une condensation acide acétique-ammoniaque. Si les *Brettanomyces* ne peuvent être tenus pour responsables dans tous les cas de cette altération, il n'est pas exclu, après les observations faites, que ces levures y jouent assez souvent un rôle.

Tableau 7. *Caractères organoleptiques des cultures sur moût de raisin de quelques Brettanomyces*

	Odeur sure.	Acétate d'éthyle	Acétamide	Odeur fruitée	Observations
<i>Brett. bruxellensis</i>	+		++	+	Odeur butyrique
<i>Brett. clausenii</i> .	+	+	+	+	
<i>Brett. lambicus</i> . .	+		+		Parfum de bon vinaigre
Quinsac . . . . .		+	++		Odeur de miel
Saint-Emilion . .	+		++	+	
Arbois 6 . . . . .			+	+	
Arbois 8 . . . . .			+	+	
Geisenheim 1 . .		+	++	+	
Geisenheim 2 . .	+	+	+	+	

### Discussion

Après l'étude approfondie des caractères morphologiques et physiologiques de ces levures, leur identification et leur classification sont relativement faciles. D'abord il ne fait aucun doute que ces levures isolées de vins rouges de Bordeaux, de vins jaunes du Jura, de vins mousseux allemands, appartiennent au genre *Brettanomyces*. Nous confirmons pleinement à ce sujet les conclusions de BARRET et ses collaborateurs et celles de SCHANDERL. La forme des cellules, l'aspect des cultures, mais surtout leur développement et leur métabolisme très lents, leurs propriétés acidogènes et estérogènes, la formation des divers produits secondaires, leurs besoins en facteurs de croissance et les caractères organoleptiques typiques que ces levures confèrent au milieu fermenté, font qu'elles se confondent absolument, en ce qui concerne la diagnose du genre, avec les souches de référence étudiées parallèlement.

Les *Brettanomyces* isolés de vins appartiennent à deux espèces distinctes: cinq souches se caractérisent par la fermentation et l'assimilation des glucose, galactose, saccharose et maltose, tandis que la souche N° 1 de Geisenheim ne fait pas fermenter le saccharose et le maltose, mais assimile le saccharose. La différence est nette aussi dans l'utilisation du nitrate de potassium, nulle pour cette dernière souche, positive pour les autres, dans le fait également que la souche N° 1 de

Geisenheim ne forme pas de voile, tandis que les autres souches présentent toutes plus ou moins des développements superficiels.

Il ne fait aucun doute, non plus, que ces deux espèces soient nouvelles. Elles n'ont pas été décrites par CUSTERS, ni dans la récente monographie de LODDER et KREGER-VAN RIJ. Les tests de fermentation des sucres sont à ce sujet décisifs. La première espèce se différencie de *Brett. bruxellensis* par la fermentation et l'assimilation du galactose, par l'utilisation des nitrates. Ne faisant pas fermenter le lactose, elle s'éloigne de *Brett. clausenii*. BARRET et ses collaborateurs ont nommé cette levure *Brettanomyces bruxellensis* va. *vini*. En réalité, il y a entre *Brett. bruxellensis* et cette levure beaucoup plus qu'une différence de variété. Ce sont des espèces nettement distinctes et pour exprimer cette différence, nous appelons cette espèce nouvelle, comprenant en particulier les levures étudiées à Bordeaux, *Brettanomyces vini*.

La souche N° 1 de Geisenheim n'a rien de commun avec les précédentes, non plus qu'avec *Brettanomyces clausenii* ou *Brettanomyces lambicus*. D'un autre côté, elle se distingue de *Brettanomyces anomalus* par le fait qu'elle n'est pas capable de faire fermenter le lactose et par la forme de ses cellules. Nous proposons de nommer cette nouvelle espèce *Brettanomyces schanderlii*, en hommage au Prof. SCHANDERL qui l'a isolée et découverte, et a attiré l'attention sur l'importance oenologique de ces levures dans certains cas spéciaux.

### Résumé

Les auteurs ont étudié comparativement des souches de *Brettanomyces* isolées de vins de diverses origines et dans diverses circonstances. En plus des tests habituels de classification, portant surtout sur les caractères morphologiques et sur la fermentation et l'assimilation des différents sucres, il a été procédé notamment aux mesures des intensités respiratoire et fermentatives, à l'établissement des bilans analytiques des produits secondaires formés, à l'étude des besoins en facteurs de croissance.

Ces *Brettanomyces* provenant de vins appartiennent à deux espèces nouvelles, différentes des espèces isolées de la bière. Les auteurs proposent de les nommer *Brettanomyces vini* et *Brettanomyces schanderlii*.

### Bibliographie

AGOSTINI, O.: Polimorfismo esogene et endogeno nei lieviti del genere *Brettanomyces*. L'Agricoltura italiana, **50**, 193 (1950). — BARRET, A., P. BIDAN et L. ANDRE: Sur quelques accidents de vinification dus à des levures à voile. C. r. Acad. Agric. **41**, 426 (1955). — DOMERCQ, S.: Étude des levures des moûts et des vins de la Gironde. Thèse d'Ingénieur-Docteur, Bordeaux 1956. — FLORENZANO, G.: La microflora blastomicetica dei mosti a dei vini di alcune zone toscane. Annali Sperim. Agrar., **3**, 887 (1949). — GENEVOIS, L., E. PEYNAUD et J. RIBEREAU-GAYON: Sur un bilan des produits secondaires de la fermentation alcoolique. C. r. Acad. Sci.



(Paris) **223**, 693 (1946). — KRUMBHOLZ G., et W. TAUSCHANOFF: *Mycotorula intermedia* n. sp., ein Beitrag zur Kenntnis der Gärungserreger im Wein. Zbl. Bakter. Abt. II **88**, 366 (1933). — LODDER, J., et N. J. W. KREGER-VAN RIJ: The yeasts — A taxonomic study. Amsterdam: North. Holland Publis. Co, 1952. — PEYNAUD, E.: Bilans des produits secondaires de la fermentation alcoolique. Différenciation physiologique des levures. Ind. agric. alim. **65**, 99 (1948). — PEYNAUD, E., et M. LAFON: Bilans des produits secondaires de la fermentation alcoolique pour divers genres de levures et dans des conditions différentes d'aération. Ind. agric. alim. **69**, 397 (1952). — SCHANDERL, H., et M. DRACZYNSKI: *Brettanomyces*, eine lästige Hefegattung im flaschenvergorenen Schaumwein. Wein und Rebe **20**, 462 (1952). — VERONA, O.: Aspetti e problemi relativi agli agenti della fermentazione vinaria, Atti Acc. Ital. Vite Vino **3**, 203 (1951). — VERONA, O., et G. FLORENZANO: Sulla presenza e l'intervento, nella fermentazione vinaria, di alcune specie di *Brettanomyces*. Ric. Sci. **17**, 9 (1947). — VERONA, O., et G. FLORENZANO: Alcune considerazioni sopra i lieviti filamentosi presenti nelle uve e nei vini. L'Agricoltura Italiana **47**, 113 (1947).

Une bibliographie complète concernant les bilans de fermentation se trouve dans la thèse de sciences physiques de Madeleine LAFON: Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique. Ann. Technologie agric. **4**, 169, 241 (1955).

(Aus dem Botanischen Institut der Universität München)

## Zur Analyse der Bakterienhemmstoffe aus der Wurzel vom Schöllkraut und ähnlichen Pflanzen \*

Von

FRANZ BUKATSCH, München

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. Januar 1956)

Die erste ausgedehnte Untersuchung über die Verbreitung des freilebenden stickstoffbindenden Bodenbakteriums *Azotobacter* im Wurzelbereich höherer Pflanzen verdanken wir POSCHENRIEDER (1930). Er fand *Azotobacter* (*Az.*) ziemlich allgemein in der Rhizosphäre sehr vieler Pflanzen, besonders in den Sommermonaten; zur Zeit der Vegetationsruhe, wenn Wurzelreste absterben, tritt *Az.* zugunsten von Fäulnisbakterien (Fluorescenten u. a.) vielfach stark in den Hintergrund. POSCHENRIEDER beschreibt aber auch eine Reihe von Pflanzen, in deren Wurzelbereich er *Az.* nicht finden konnte. Die Ursachen hierfür wurden im einzelnen nicht weiter verfolgt. Der Autor teilt die Meinung von HILTNER, daß zwischen Wurzel und der Mikroflora ihrer engeren Umgebung (Rhizosphäre) Wechselbeziehungen bestehen; er schreibt (l. c., S. 376): . . . „Bedeutungsvoll dürfte für das Bakterienleben mit der Umstand sein, daß von den Wurzeln verschiedener Pflanzen verschiedene Stoffe ausgeschieden werden . . .“ — ein Gedanke, der sich in späteren Arbeiten als durchaus fruchtbar erwies.

Gemeinsam mit HEITZER untersuchte ich 1950—52 die Rhizosphäre vieler höherer Pflanzen, um davon *Az.* zur Klärung der Rassenfrage dieses Bakteriums zu isolieren. Dabei fiel auch uns die oben erwähnte Erscheinung auf, daß unmittelbar an den Wurzeln bestimmter Pflanzen *Az.* nicht, oder doch nur ganz ausnahmsweise, anzutreffen ist. Da unter Umständen vorhandene Säureabscheidungen der Wurzel zur Erklärung des Befundes nicht hinreichten, weil sie sich nicht im entscheidenden Ausmaß im Boden nachweisen ließen und die Pflanzen aus gepflegten, nicht versauerten Böden (Botanischer Garten und anderen Gärten Münchens und Umgebung) stammten, äußerten wir die Vermutung, daß Hemmstoffe aus den intakten Geweben höherer Pflanzen auszutreten und das Bakterienwachstum in der unmittelbaren Umgebung zu beeinflussen vermögen.

1954 konnte ich anläßlich eines Übersichtsreferates über freilebende Stickstoffbinder im Boden<sup>1</sup> die Behauptung aufstellen, daß beim Schöllkraut (*Chelidonium majus*, einer in vieler Hinsicht interessanten, allgemein verbreiteten Pflanze) bestimmte Alkaloide die Ursache für das Zurücktreten von *Az.* in der Rhizosphäre darstellen (vgl. dazu BUKATSCH 1955; dort auch Abbildung über Hemmwirkung aufgelegter, ganzer *Chelidonium*-Wurzeln auf *Az.*-Dichtsamt).

1955 beschreibt METZ bei seinen „Untersuchungen über die Rhizosphäre“ starke Hemmwirkungen einiger Wurzeln auf die umgebende Mikroflora, darunter auch die des Schöllkrauts. Da die Versuche zum Teil mit Wurzel-Preßsäften im Lochtest

\* Herrn Prof. Dr. HUGO BRAUN zum 75. Geburtstag gewidmet.

<sup>1</sup> Vortrag im Rahmen des 8. internationalen Botanikertreffens in Paris, gehalten im Institut Pasteur am 3. Juli 1954. Kurzreferat darüber in den *Rapports et Communications du Congrès*, Sect. XXI, S. 17.

durchgeführt wurden, sind deshalb auch stärkere Wirkungen als am natürlichen Standort zu erwarten<sup>1</sup>. Wichtig für unsere Fragestellung ist der Umstand, daß METZ auch einen *Az*-Stamm (Göttingen, Nr. 1602) in seine Versuche einbezog. Vielen Wurzeln gegenüber, die auf die übrige Mikroflora hemmend wirkten, war *Az.* ziemlich unempfindlich; sehr wirksam erwiesen sich aber auch hier scharfer Hahnenfuß (*Ranunculus acer*) und wieder das Schöllkraut. Die Art der Hemmstoffe wurde aber nicht näher untersucht. Da METZ auch die Abzüchtung von *Az.* aus der Rhizosphäre von *Chelidonium* mißlang, gelangt er für diese Pflanze zu folgendem Schluß: „... der Zusammenhang zwischen dem Fehlen von *Azotobacter* an der Wurzel und der starken Hemmwirkung dieser Wurzel ist so deutlich, daß auf eine direkte Wirkung der hemmenden Wurzelstoffe außerhalb der Wurzel geschlossen werden muß“ (l. c., S. 320 unten).

Ich habe wiederholt und zu verschiedenen Jahreszeiten versucht, aus der den Schöllkrautwurzeln unmittelbar anhaftenden Erde *Az.* zu züchten; ein positiver Ausfall ergab sich nur in ganz vereinzelt Fällen. Die so gewonnenen Kulturen erwiesen sich aber im Verlauf mehrerer Übertragungen auf Frischnährböden als schlecht lebensfähig. Die Zellen dürften eine verringerte Vitalität aufweisen. Auf einen dieser Stämme (*Chel. I*) kommen wir später noch zurück.

### Die in *Chelidonium* vorhandenen Wirkstoffe

Die vorliegende Untersuchung setzt sich das Ziel, die Bakterienhemmstoffe des *Chelidonium*-Rhizoms zu identifizieren; zum Vergleich wurden auch Wurzeln anderer Pflanzen mit ähnlichen Inhaltsstoffen herangezogen. Nach HENRY (1949) sind im Schöllkraut folgende Hauptalkaloide enthalten: Chelidonin und Homochelidonin, Oxy- und Methylchelidonin; Chelerythrin, Sanguinarin; Protopin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Allocriptopin; Berberin und Spartein.

Die Blutwurzel, *Sanguinaria canadensis*, die wir zum Vergleich herangezogen, enthält im blutroten Rhizom neben Chelerythrin und Sanguinarin noch Oxy-Sanguinarin, Allocriptopin und Protopin, die *Hydrastis*-Wurzel vorwiegend Berberin und Hydrastin, bzw. Hydrastinin. Um die Erforschung der Schöllkraut- und Blutwurzel-Inhaltsstoffe haben sich GADAMER und seine Schule (1924a, b und viele andere) große Verdienste erworben.

Die seinerzeit von GADAMER und seinen Schülern angewandten Trennungsmethoden (Ausfällung mit Mineralsäuren, Cyaniden, Lösen und Verteilen in verschiedenen Solventien, fraktionierte Kristallisation) erfordern Stoffmengen, die uns nicht zur Verfügung standen, und sind außerdem recht umständlich und zeitraubend.

<sup>1</sup> Eigene Versuche mit abgeschnittenen Löwenzahnwurzeln, die auf *Az.*-Dichtsaatplatten aufgelegt wurden, sprechen dafür: Es wurden nur dort Hemmungen des Bakterienwachstums beobachtet, wo aus Wundstellen der Wurzel Milchsaft austrat. *Az.* läßt sich aus der Rhizosphäre von Löwenzahn unschwer isolieren.



Als moderne, auch für kleine Substanzmengen geeignete Trennverfahren boten sich Papier-Elektrophorese bzw. -Chromatographie an. Meines Wissens liegen aber für *Chelidonium*-Alkaloide auf diesem Gebiet noch keinerlei Angaben in der Literatur vor; es galt also, selbst brauchbare Arbeitsverfahren hierzu zu entwickeln.

### Neue Trennungungsverfahren für *Chelidonium*alkaloide

Da alle in Frage kommenden Stoffe gut alkohollöslich sind, wurde die Extraktion der frischen, nach Waschen und Entfernen der verunreinigten äußeren Rindenteile gewogenen Wurzelstücke durch Zerreiben im Mörser mit Quarzsand mit 95% reinem Äthanol vorgenommen. Der tief-braunrote Auszug wurde anschließend filtriert („Roh-extrakt“).

Zunächst wurde die Aufteilung des Rohauszuges im elektrischen Gleichspannungsfeld versucht: in der Mitte eines 30 cm langen, 3 cm breiten Streifens von Schleicher-Schüll-Chromatographiepapier 2043 b wurde mittels Pinsels ein Querstrich aufgetragen und versuchsweise in Pufferlösungen verschiedener  $pH$ -Werte im

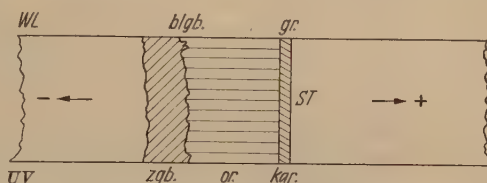


Abb. 1. Elektropherogramm des *Chelidonium*-Rohauszuges 150 V, 20 Std, Elphor,  $pH$  4,7.

Zeichenerklärung: WL im weißen Licht, UV im Ultraviolett, ST Start. bl.gb. bläß gelb, gr. grau, zgb. zitronengelb, or. orange, kar. karmin.

„Elphor“-Gerät nach GRASSMANN bei 150 V zu trennen versucht. Nach Angaben von DECKERS u. SCHREIBER, die im Elphor andere Alkaloide aufarbeiteten (1953), wird der beste Trenneffekt — je nach Art des Stoffes — bei verschiedenem  $pH$ -Wert erzielt. In unseren Versuchen zwischen  $pH$  2—9 erwiesen sich die mäßig sauren Bereiche (etwa zwischen 4 und 5) als ziemlich günstig, doch war bei der verfügbaren Spannung (150 V) nach 20 Std der Laufweg erst 6 cm und die Trennung noch ungenügend. Abb. 1 soll eine Vorstellung davon geben, wie ein solches Elektropherogramm in Acetapuffer ( $pH$  = 4,7) im Tageslicht und unter der UV-Analysenlampe aussieht (die Farbzonen sind bei gewöhnlichem Licht sehr blaß, treten aber im Ultraviolett durch Fluoreszenz deutlich hervor):

Alkoholische Rohauszüge lassen sich elektrophoretisch besser trennen als Extrakte, die mit verdünnter Essigsäure hergestellt wurden.

Um rascher und besser zum Ziel zu gelangen, wandte ich mich der Papierchromatographie zu.

Es wird aufsteigend in Standzylindern gearbeitet; 25 cm lange Streifen des Papiers 2043 b gelangen mehrmals unter zwischenzeitlichem Trocknen (Elektrofön) mit der Schmalseite in den alkoholischen Rohauszug, bis dieser etwa 1 cm hoch (zur Startlinie) aufgestiegen ist. Durch das wiederholte Tauchen des zwischendurch getrockneten Papiers reichern sich die Inhaltsstoffe kapillar an der Startlinie an. Nach letztem sorgfältigen Trocknen wird der Streifen in den Zylinder mit dem geeigneten Lösungsmittel gebracht. Nach einigen Vorversuchen mit verschiedenen Alkoholen (Methanol bis Butanol) und unterschiedlichen Konzentrationen wurde zur Chromatographie 80 vol. % igem Äthanol der Vorzug gegeben.

Nach neuesten Angaben (E. MERCK: „Säulenchromatographie. Papierchromatographie“, Darmstadt 1955) soll eine befriedigende papierchromatographische Auf-

teilung von Alkaloiden nur in sauren, bzw. alkalischen Solventien möglich sein; wir verwendeten daher auch Zusätze von 1% Eisessig, bzw. 3% konz. wäßriger Ammoniaklösung zu 80% Äthanol, ohne schärfere Zonen zu erhalten; im Gegenteil, die Rf-Werte lagen zum Teil ungünstiger, worauf wir bei Besprechung der Identifikation der Wirkstoffe noch zurückkommen.

Die aufsteigende Methode ergibt in einigen (3—10) Stunden eine recht befriedigende Aufteilung in zwar bei Tageslicht nur blaß gefärbte, unter der Analysenlampe aber unterschiedlich und prächtig fluorescierende Zonen. Die folgende Abbildung (Abb. 2 a, b, c) stellt die an alkoholischen

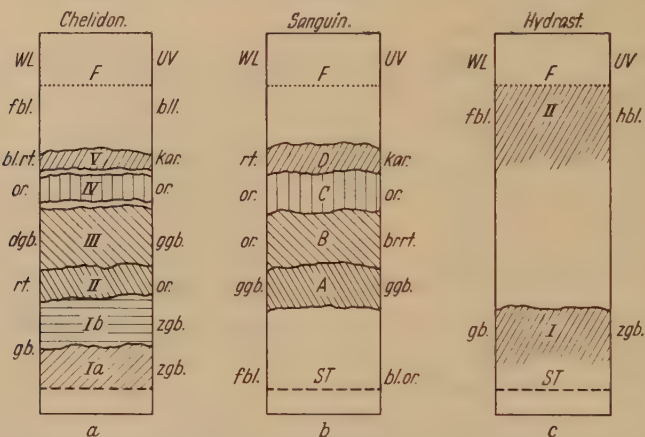


Abb. 2. Chromatogramme von Rohauszügen auf Schleicher & Schüll Nr. 2043b, aufsteigend mit 80% Äthanol. Zeichenerklärung: ST Start, F Front, WL weißes Licht, UV Ultraviolett. fbl. farblos, bl. bläulich, bl.rt. blaß rötlich, karm. karmin, or. orange, dgb. dottergelb, ggb. goldgelb, rt. rot, gb. gelb, zgb. citronengelb, brrt. braun-rötlich, bl.or. blaß orange, hbl. hellblau.

Die röm. Zahlen und Großbuchstaben geben die Zonen an

Rohauszügen von *Chelidonium* (a), *Sanguinaria canadensis* (b) und *Hydrastis canadensis* (c) erzielten Ergebnisse vergleichend gegenüber:

Beim *Hydrastis*-Chromatogramm war die Analyse recht einfach: die untere, gelbe und gelb fluorescierende Zone stellt das Berberin dar, die obere farblose, im UV hellblau leuchtende Zone das Hydrastin(in). Die stark citronengelb fluorescierende Zone des Berberins fehlt im *Sanguinaria*-Chromatogramm, was mit den Literaturangaben gut übereinstimmt; hier traten die goldgelben bzw. rötlich gefärbten und fluorescierenden Zonen hervor, die vermutlich dem Chelerythrin bzw. Sanguinarin zuzuordnen sind (genauere Analyse später!). Bei *Chelidonium* fanden sich alle diese Komponenten; auch das Berberin als langsamst wandernder Stoff tritt deutlich hervor. Berberin in *Chelidonium* wurde chromatographisch von uns schon 1941 nachgewiesen (BUKATSCH 1941).

Zunächst ließen sich über die Natur der getrennten Substanzen nur Vermutungen aussprechen; sie gehören aber offenbar den fluorescierenden Alkaloiden an, die gefärbte Salze bilden können. Vorerst wurde die Identifikation direkt am Chromatogramm mit Tüpfelreaktionen (konz. Ammoniaklösung bzw. Schwefelsäure) versucht, und zwar am Schöllkrautchromatogramm:

Zone II und III blaßten beim Betropfen mit Ammoniak zu schwachem Gelblich aus; mit Schwefelsäure ergab sich Farbvertiefung nach Orange.

Die Zonen IV und V entfärbten sich mit Ammoniak völlig, wurden aber mit Schwefelsäure blutrot.

Das Ergebnis läßt bei II und III das Vorhandensein von Chelerythrin, für IV und V das Auftreten von Sanguinarin vermuten. Der endgültige Beweis gelang uns aber erst durch freundliches Entgegenkommen von Herrn Prof. BÖHME<sup>1</sup>, der uns aus der Sammlung des Marburger pharmazeutisch-chemischen Universitätsinstitutes Originalpräparate GADAMERS von Chelidonin, Chelerythrin und Sanguinarin in kleinen Proben vermittelte. Berberin als freie Base und als Sulfat war im Handel erhältlich.

Zur Identifikation ließen wir nun neben dem *Chelidonium*-Rohextrakt auch noch Proben der erhaltenen Reinstoffe (Berberin als Sulfat, Chelerythrin als Bitartrat, Sanguinarin als selbst gefertigtes Acetat) im gleichen Chromatogramm mitlaufen; der Versuch wurde mehrfach wiederholt. Das Ergebnis ist in Abb. 3 dargestellt. Bei der Lösung des kaum wasserlöslichen Reinsanguinarins in Essigsäure stellte sich sofort eine tief-blutrote Färbung ein, was mit der Säurewirkung in den Tüpfelversuchen gut übereinstimmt.

Häufig traten bei den Reinstoffen zwei in einigem Abstand untereinander liegende, gleichfluorescierende Flecke auf, was ich auf eine Spaltung des Salzes zum Teil in freie Base zurückführen möchte. Auffällig war ferner, daß die Chelerythrinprobe im UV unter der goldgelb leuchtenden Hauptzone einen schwächeren, citronengelb leuchtenden Streifen aufwies. Zweifellos handelt es sich hier um kleinste Berberin-Beimengungen des an sich reinen Chelerythrins — dies spricht für die

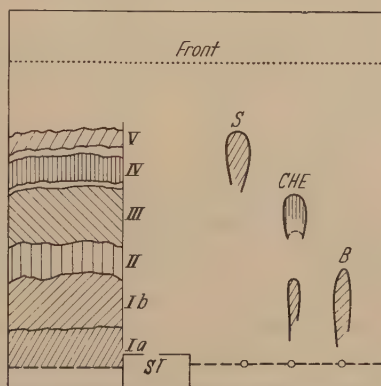


Abb. 3. *Chelidonium*-Chromatogramm (links), mitlaufende Teststoffe (rechts): Versuchsbed. wie bei Abb. 2. Zeichenerklärung: ST Start, B Berberin, CHE Chelerythrin, S Sanguinarin

<sup>1</sup> Dem Direktor des Pharmazeutisch-chem. Universitätsinstitutes in Marburg/L., Herrn Prof. Dr. H. BÖHME, möchte ich hierfür ergebenst danken.



außerordentliche Empfindlichkeit der Fluoreszenz-Chromatographie. Da die einzelnen Zonen oben zwar eine scharfe Begrenzung („Kopf“) mit der Hauptmenge des Stoffes aufwiesen, dahinter aber einen allmählich verlaufenden „Schwanz“, wurde die oben erwähnte „saure“, bzw. „alkalische“ Chromatographie erprobt. Abb. 4 stellt zum Vergleich die Ergebnisse in 80% Äthanol, sowie mit Zusätzen von 1% Eisessig und 3% wäßrigem Ammoniak gegenüber. Im ammoniakalischen Solvens waren die Flecke sehr blaß (wohl vorwiegend freie Alkaloidbasen), traten aber bei Trocknung (Verflüchtigung des  $\text{NH}_3$ ) wieder besser hervor.

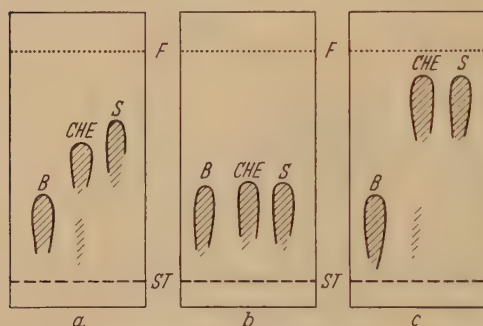


Abb. 4. *Chelidonium*-Chromatogramme mit: a 80% Alkohol, b 80% Alkohol + 1% Eisessig, c 80% Alkohol + 3% Ammoniak. Zeichenerklärung: ST Start, F Front, B Berberin, CHE Chelerythrin, S Sanguinarin

Abgesehen davon, daß die Trennschärfe kaum gewonnen hatte, liefen in der sauren Lösung die drei Alkaloide praktisch gleich rasch. Dieses Gemisch schied somit aus. Bei Ammoniakzusatz wurde zwischen dem Berberin, das relativ zu den anderen gebremst wird, und den anderen Stoffen zwar ein besserer Abstand erzielt, dafür aber lief das Chelerythrin nun gleich schnell wie

Sanguinarin, nämlich fast mit der Lösungsmittelfront. Ein einigermaßen schärferer Absatz des Berberins bei ungestörtem Verhalten von Chelerythrin und Sanguinarin ergibt sich in folgendem Gemisch: Äthanol 80 Teile, Wasser und  $\text{m}/15 \text{ Na}_2\text{HPO}_4$  je 10 Teile. Dies ist meines Erachtens das günstigste Trennmittel für die *Chelidonium*-Wirkstoffe.

Bemerkenswert ist die Erscheinung, daß die Zonenfolge im Elektropherogramm (vgl. Abb. 1) genau umgekehrt wie im aufsteigenden Chromatogramm liegt. Aus dem elektrophoretischen Trennprinzip ergibt sich, daß *cet. par.* der am stärksten geladene Stoff im Potentialgefälle am schnellsten wandert; dies träfe unter den Schöllkrautalkaloiden in unserem Elphor-Versuch für das Berberin zu. Neben Verteilungsvorgängen zwischen verschiedenen Phasen sind meines Erachtens bei der Papierchromatographie vielfach auch elektrische Bindekräfte an der (geladenen) Papierfaser wirksam; die elektronegative Cellulosefaser erfährt durch den 80%igen Alkohol keine Ladungsveränderung; die Alkaloide haben (zumindest als Salze) kationische Eigenschaften. Sie werden bei starker Eigenladung mehr von der Papierfaser festgehalten; so ließe sich der niedere  $R_f$ -Wert des Berberins als Sulfat mit dem rascheren Laufen im Elektropherogramm gegenüber den anderen Komponenten erklären.

Da die Zonen nach rückwärts nicht scharf begrenzt sind, können wir nur annähernde Rf-Werte für die uns interessierenden Stoffe unter unseren Versuchsbedingungen (Schleicher-Schüll-Papier 2043 b, 80 vol.-% Äthanol) angeben; es sind Mittelwerte aus je 5 Bestimmungen und zum Vergleich werden in Tab. 1 die Rf-Zahlen bei Essigsäure- (1%) und Ammoniakzusatz (3%) mitaufgeführt.

Tabelle 1. *Papierchromatographische Charakteristik einiger Chelidonium-Alkaloide*

Stoff	Farbe im		Rf-Werte entwickelt in		
	Tageslicht	UV	80% Alkohol	+ 1% Eisessig	+ 3% Ammoniak
Berberin . . .	bläßgelb	citronengelb	0,30	(0,45)	(0,30)
Chelerythrin . .	dotterfarben	goldgelb	0,63	(0,45)	(0,88)
Sanguinarin . .	rötlich	orangerot	0,74	(0,49)	(0,89)

### Die Wirkung der einzelnen Komponenten aus den Rhizomen von *Chelidonium*, *Sanguinaria* und *Hydrastis* auf *Azotobacter*

Zunächst wurden orientierend im Lochtest Kaltwasser-Wurzelauszüge gegenüber einem *Az. chroococcum*-Stamm (von *Mirabilis jalapa*-Wurzel abgezüchtet, kurz als „*Mirabilis*“ bezeichnet) geprüft. Die Dichtsaaat erfolgte durch Ausstreichen der Bakterienaufschwemmung mittels Spatels auf 2%-Mannitagar mit Molybdatzusatz<sup>1</sup>. Um den Schöllkrautextrakt zeigte sich nach zwei Tagen eine deutliche Hemmzone von einigen Millimetern Breite; andere *Az.*-Stämme waren viel empfindlicher, besonders

Tabelle 2. *Wirkung von Sanguinaria- und Hydrastis-Auszügen auf Azotobacter*

Art des Extraktes	Hemmzonen in mm	
	bei <i>ATCC 4412</i>	bei <i>BLK 1</i>
<i>Sanguinaria canadensis</i> .	15 mm, scharf	diffus, nicht meßbar
<i>Hydrastis canadensis</i> . .	völlige Hemmung	10 mm, scharf begrenzt

der amerikanische Stamm *ATCC 4412*, den uns Herr Prof. Dr. A. JANKE, Wien, dankenswerterweise überließ. *ATCC 4412* erwies sich auch gegenüber den Kaltwasserauszügen anderer Wurzeln besonders stark hemmbar: Nach 2 Tagen Kultur waren bei ihm die Hemmungshöfe viel größer als etwa bei dem *Az. vinelandii*-Stamm *BLK 1* (aus Delft, Holland); dies sei in Tab. 2 an der Wirkung von *Sanguinaria*- und *Hydrastis*-Auszügen veranschaulicht.

Im *Hydrastis*-Wurzelstock sind also bakterienschädigende Stoffe vorhanden; da unser Chromatogramm nur zwei Alkaloide erkennen läßt,

<sup>1</sup> 2% Mannit, je 0,05%  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$  und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , je 0,005%  $\text{FeSO}_4$  und  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ .

das gelb fluoreszierende Berberin und das blau leuchtende<sup>1</sup> Hydrastin, sei der Einfachheit wegen mit der Wirkungsanalyse der *Hydrastis*-Stoffe begonnen.

Aus den sorgfältig durch Trocknen von Alkoholspuren befreien, nach der oben gegebenen Vorschrift hergestellten Chromatogramm (vgl. Abb. 2c) wurden mit geschärftem Korkbohrer Blättchen mit 1 cm Durchmesser ausgestanzt und auf einer mit Spatelausstrich hergestellten Az.-Dichtsaat aufgelegt. Jeweils 4 Scheibchen aus der Zone I und II kamen, genau übereinandergelegt und mit destilliertem Wasser bis zur Sättigung befeuchtet, zur Wirkung. Tab. 3 zeigt das Ergebnis. Es ist nicht nur die viel stärkere Wirkung auf Stamm *ATCC 4412* zu erkennen, sondern auch, daß das Berberin wesentlich kräftiger als das Hydrastin hemmt. Beim amerikanischen *Az. chroococcum*-Stamm ist aber auch eine deutliche Schädigung des Bakterienwuchses durch das letztgenannte Alkaloid unverkennbar (Tab. 3).

Tabelle 3. Wirkung der Berberis- und Hydrastis-Alkaloide auf *Azotobacter*

Stamm	<i>Hydrastis</i> -Chromatogramm		Hemmungshofbreite in mm
<i>Az. chrooc. ATCC 4412</i>	Zone I	Berberin	25 mm, scharf begrenzt
	Zone II	Hydrastin(in)*	etwa 5 mm, scharf begrenzt
<i>Az. vinelandii, BLK 1</i>	Zone I	Berberin	6 mm, scharf begrenzt
	Zone II	Hydrastin(in)	etwa 1 mm, angedeutet

\* Hydrastinin ist das blau fluoreszierende Oxydationsprodukt von Hydrastin (vgl. H. ERBRING u. W. WULF, Kolloid-Z. 125, 99, 1952).

Ebenfalls mittels Scheibchentest wurden die Zonen A—D des *Sanguinaria*-Chromatogramms ausgewertet (vgl. Abb. 2b). Während Stamm *BLK 1* nur ein diffus-schwächeres Wachstum (im Vergleich zur Kontrolle) aufwies und mehr gelben Farbstoff in das Substrat abschied, was meist ein Zeichen ungünstiger Lebensbedingungen darstellt, waren bei Stamm *ATCC 4412* scharf begrenzte, gut meßbare Hemmungshöfe feststellbar; das Ergebnis nach zweitägiger Kultur findet sich in Tab. 4:

Tabelle 4. Wirkung der *Sanguinaria*-Alkaloide auf *Azotobacter ATCC 4412*

<i>Sanguinaria</i> -Chromatogramm		Hemmungshofbreite in mm
Zone A	vorw. Chelerythrin	13 mm, scharf begrenzt
Zone B	Chelerythrin	12 mm, scharf begrenzt, dunkle Randzone der Bakterien
Zone C	vorw. Chelerythrin	13 mm, scharf begrenzt
Zone D	Sanguinarin	7 mm, scharf begrenzt

<sup>1</sup> Der blau-fluoreszierende Stoff ist eigentlich das Oxydationsprodukt Hydrastinin.



Die Ausbildung der Melaninzone am inneren Rand der Kultur, d. h. an der Grenze der Hemmzone bei Fraktion B, läßt auf einsetzende Schwächung der Lebenskraft der Bakterien schließen, tritt sie doch normalerweise bei *Az. chroococcum* erst bei alternden Kulturen auf. Somit erweist sich für *Sanguinaria* das Chelerythrin stärker schädigend als das Sanguinarin.

Alle Zonen des *Chelidonium*-Chromatogrammes (vgl. Abb. 2a, Ia, b . . . V) prüften wir in der oben beschriebenen Art gegenüber drei *Az.*-Stämmen. Zu *ATCC 4412* und *BLK 1* kam ein Stamm, den wir aus Erde in der Nähe einer Schöllkrautwurzel, also aus der „weiteren Rhizosphäre“, im Sinne von POSCHENRIEDER isolieren konnten. Zum Formenkreis *Az. chroococcum* gehörig, bildet er Melanin, wächst aber im Vergleich zu den anderen Stämmen nicht gut: Stamm „*Chelid. I*“. METZ (l. c.) gibt an, daß Mikroorganismen der eigenen Rhizosphäre bestimmter Pflanzen gegen die Wurzelausscheidungen ziemlich widerstandsfähig seien; so muß es überraschen, daß sich unser Stamm gegen die Inhaltsstoffe der Schöllkrautwurzel doch als empfindlich erwies, wie aus Tab. 5 hervorgeht:

Tabelle 5. Wirkung von *Chelidonium*-Alkaloiden auf *Azotobacter*-Arten  
(Aus jeder Zone des *Chelidonium*-Chromatogrammes je 3 Scheibchen von 1 cm Ø aufgelegt, Wirkung nach: a...2, b...5 und c...8 Tagen)

Zone	Wirkstoff	Breite der Hemmungshöfe in mm						
		<i>ATCC 4412</i>			<i>BLK 1</i>	<i>Chelid. I</i>		
		a	b	c		a	b	c
Ia } Ib }	Berberin	2	1,5	1,5	diffuses, schwaches	10	8	8
		8	8	8		15	15	15
II } III }	Chelerythrin	15	15	15	Wachstum	3	3	3
		20	20	20		8	8	6
IV } V }	Sanguinarin	6	5	5	kaum erkennbares Wachstum	—	—	—
		2	2	2		2	2	2

*ATCC 4412* spricht also besonders auf Chelerythrin an, deutliche Wirkung zeigt auch das Berberin; schwächer als dieses hemmt Sanguinarin. Beim *Chelidonium*-Stamm finden wir eine sehr ausgeprägte Schädigung durch das Berberin, die anderen Alkaloide treten dagegen sehr zurück; Sanguinarin ist hier kaum wirksam. Der *BLK 1* (*Az. vine-landii*-Stamm) gab sein allgemein geringeres Wachstum auch durch stärkere Flavinbildung (Gelbfärbung des Substrates) zu erkennen.

METZ (l. c.) stellte auch Fernwirkungen von Wurzelausscheidungen im Boden fest; wir neigen zur Ansicht, daß sich die Wirkung in einigem Abstand von der Wurzel rasch im Boden verliert: sei es durch Adsorption der immerhin recht großmolekularen Stoffe an Bodenkolloiden, sei es durch mikrobielle Zersetzung der Wirkstoffe, vielleicht ähnlich, wie *Escherichia coli* die Antibiotica von *Penicillium*

fermentativ zu zerstören vermag. Für den Fall *Chelidonium* schreibt METZ (l. c., S. 320 unten): „... der Zusammenhang zwischen dem Fehlen von *Azotobacter* an der Wurzel und der starken Hemmwirkung dieser Wurzel ist so deutlich, daß auf eine direkte Wirkung der hemmenden Wurzelstoffe außerhalb der Wurzel geschlossen werden kann.“

Eine nähere Analyse der hier in Betracht kommenden Wirkstoffe führte aber METZ nicht durch; hier hofft die vorliegende Arbeit eine Lücke in unseren Kenntnissen über die interessanten Wechselbeziehungen zwischen der höheren Pflanze und ihrer Rhizosphäre zu schließen.

### Halbquantitative Testung der Wirkung der Schöllkrautalkaloide auf *Azotobacter*

Die eben beschriebenen Scheibchenteste kranken daran, daß die wirklichen Mengen weitgehend unbestimmt bleiben; so kann z. B. die starke Wirkung eines bestimmten Stoffes gar nicht so sehr spezifisch sein, sondern nur auf besonders hohem Gehalt an dieser Substanz beruhen. Die bisher beschriebenen Versuche bleiben also mehr oder minder qualitativ.

Von Berberinsulfat (und dem freien Alkaloid) standen ausreichende Mengen zu Konzentrationstesten zur Verfügung; die von Herrn Prof. BÖHME freundlicherweise überlassenen Originalpräparate von Chele-rythrin und Sanguinarin reichten gerade für einige quantitative Prüfungen. So konnte die Wirkung auf das Bakterienwachstum aus dem Trübungsgrad der Flüssigkeitskultur (2° Mannitlösung mit Zusatz von Kaliumphosphat, Magnesiumsulfat und Spuren von Calciumcarbonat, Eisensulfat und Natriummolybdat), die Stoffwechselaktivität aus dem Kriterium der Stickstoffbindung bestimmt werden. Zur Messung des fixierten Luftstickstoffes diente die Halbmikro-Kjeldahlmethode nach PARNAS-WAGNER. Für eine eingehende Untersuchung der Bakterienatmung im Warburg-Apparat reichten die verfügbaren Substanzmengen nicht aus; dies soll später nachgeholt werden.

Tabelle 6. Wirkung gestufter Berberin(-Sulfat-)Konzentrationen

(Wachstum: +++ üppig, ++ gut, + deutlich, +— schwach, —+ kaum, — fehlend. Die Stickstoffbindungswerte sind in Prozent der Kontrolle angeführt)

Kultur-Zusatz	Berberin		Berberin-Sulfat	
	Wachstum	N <sub>2</sub> -Bindung	Wachstum	N <sub>2</sub> -Bindung
Kontrolle ohne . . . .	+++	100	+++	100
1 : 1000	—	—	—	—
1 : 5000	—+	etwa 1	—+	etwa 1
1 : 10000	+	58	+	60
1 : 20000			++	63

Zunächst sei die Wirkung des Berberins und seines Sulfats auf einen verhältnismäßig unempfindlichen Stamm („*Mirabilis*“) beschrieben; die Ergebnisse nach einwöchiger Kultur finden sich in Tabelle 6.

Auffallend ist der ziemlich plötzliche Sprung in der  $N_2$ -Bindung zwischen den Konzentrationen 1 : 5000 und 1 : 10000; bei letztgenannter Konzentration wird von dem genannten Stamm ein erheblicher Stickstoff-Gewinn erreicht; dies gilt aber nicht für die Stämme *ATCC 4412*, *Chelid. I* und einem von *Hieracium* abgezüchteten Stamm; diese werden bis zu Verdünnungen 1 : 20000 in Wachstum und Stickstoffbindung fast völlig gehemmt. *BLK 1* wurde bis 1 : 10000 durch Berberin stark beeinträchtigt; doch bei 1 : 30000 war gutes Wachstum und eine  $N_2$ -Bindung von rund 70% der Kontrolle erreicht.

Daraus ersehen wir, daß Berberin für die meisten *Az.*-Stämme ein starkes Gift darstellt; die Empfindlichkeit ist bei den einzelnen Rassen aber doch recht unterschiedlich.

Mit Chelerythrin konnte je ein Konzentrationsstufenversuch mit den Stämmen *ATCC 4412* und *BLK 1* durchgeführt werden. Der Kürze halber ist das Resultat in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Tabelle 7. Versuch mit Chelerythrin-Bitartrat  
(Legende wie Tab. 6)

Kultur-Zusatz	<i>ATCC 4412</i>		<i>BLK 1</i>	
	Wachstum	$N_2$ -Bindung	Wachstum	$N_2$ -Bindung
Kontrolle ohne . . .	+++	100	+++	100
1 : 10000	—	—	—	—
1 : 30000	—+	etwa 1	+—	1,2

Chelerythrin kommt demnach an Giftigkeit dem Berberin zumindest gleich, ja es ist für *Az. vinelandii* (*BLK 1*) deutlich schädlicher als dieses.

### Zur Frage des Angriffspunktes der Giftstoffe in der Azotobacterzelle

Über die Wirkung der *Chelidonium*-Inhaltsstoffe als Fluorochrome für Epidermiszellen von *Allium cepa* bei gestufterm pH-Wert berichteten wir vor vielen Jahren (BUKATSCH, 1941); deshalb lag es nahe, vital angefärbte Bakterienzellen, d. h. solche, die einige Zeit sehr verdünnten wäßrigen Lösungen von Berberinsulfat, Chelerythrinbitartrat und Sanguinarinacetat ausgesetzt waren, fluoreszenzmikroskopisch zu untersuchen. So konnte man hoffen, Einblick in den Angriffspunkt innerhalb der Zelle zu gewinnen. Da die üblichen Quecksilberhochdruckbrenner bei den hier nötigen sehr starken Vergrößerungen (Ölimmersion 100 $\times$ , Komp. Okular 15 $\times$ ) zu lichtschwach sind, ließen sich die Untersuchungen erst nach Beschaffung einer Quecksilber-Höchstdrucklampe HBO 200 erfolgversprechend in Angriff nehmen<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Herrn Prof. Dr. L. BRAUNER, dem Direktor des Münchener Botanischen Institutes, sei für die rasche Beschaffung der nötigen Einrichtung ergebenst gedankt.



Über fluoreszenzmikroskopische Feinstrukturuntersuchungen an *Az.* gibt es meines Wissens bisher nur einige Veröffentlichungen: A. KRIEG teilte mit, daß sich mit Berberinsulfat bis zu 10 gelbgrün fluoreszierende Körnchen in den Zellen von *Azotobacter* nachweisen lassen, die unter Umständen als Chondriosomen-Äquivalente angesprochen werden könnten.

Wir konnten in unserer Nachprüfung diesen Befund voll bestätigen. Es wurden zwei Methoden angewendet: einmal wurden Tropfen sehr verdünnter Berberin-, Chelerythrin- und Sanguinarinsalzlösungen auf Dichtsaatplatten älterer Kulturen aufgesetzt und nach einigen Stunden die Bakterien im UV-Mikroskop geprüft, zum anderen wurden ganz junge Zellen, von 24-stündiger Schrägagarkultur, in die stark verdünnten Lösungen eingebracht, dann abpipettiert, in Wasser aufgeschwemmt und untersucht. So konnte die Wirkung auf junge und ältere Zellen verglichen werden; im mikroskopischen Bild ergaben sich jedoch keine Unterschiede. Verwendet wurden die Stämme ATCC 4412 und *Chelid. I*. Während Sanguinarin ziemlich diffuse, blaß kupferrote Anfärbung der ganzen Zellen zeigte, ergab sich bei Berberin — und noch deutlicher bei dem goldgelb fluorochromierenden Chelerythrin ein prächtiges Bild.

Die Schleimhüllengrenzen waren durch blasse Anfärbung angedeutet, innerhalb derselben fanden sich die Zellen einzeln oder vielfach in Paaren. In deren Innerem leuchteten hell 4—6, mitunter auch mehr kleine Pünktchen auf. Die Zahl der Teilchen schien unterschiedlich; auch ich möchte diese Körperchen den Chondriosomen gleichsetzen.

STRUGGER (1949) und FLÖTHMANN (1954) fluorochromierten *Az.*-Zellen mit dem synthetischen Farbstoff Acridin-orange und beobachteten ein schwach grün leuchtendes, netzartiges Protoplasma und einige, meist 2—4, oft gepaarte, hell gelbgrün erstrahlende Körnchen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Beide Forscher sprechen die Körnchen wegen ihrer geringen Zahl und des paarigen Auftretens als „Nucleoide“ an; diese dürften mit den von uns beobachteten Körperchen nicht identisch sein.

Den Gedanken von P. EHRLICH folgend, möchte ich annehmen, daß durch die „Färbung“ d. h. die intensive Speicherung von Berberin und Chelerythrin, die sich in der starken Fluoreszenz der Teilchen kundgibt, die Chondriosomenäquivalente blockiert, d. h., in ihrer Funktion gehemmt werden. Da man heute die Chondriosomen vielfach als Fermentbildungsstätten, bzw. als Brennpunkte von Stoffumsätzen, anzusprechen geneigt ist, wäre durch „Vergiftung“ dieser Zellorganelle ein Zusammenbruch des Stoffwechsels und damit auch der Zellvermehrung verständlich.

### Die Wirkung der Schöllkrautinhaltsstoffe auf andere Bakterien

Nach RUSCHMANN (1952) ist *Az.* als empfindlicher Organismus zur Testung von Wirkstoffen besonders geeignet; andererseits schreibt METZ, daß Hemmstoffe für andere Bodenmikroben aus den Wurzeln bestimmter Pflanzen gerade bei *Azotobacter* fördernd wirken! Aus dieser Sachlage

heraus war es reizvoll, die *Chelidonium*-Alkaloide in ihrer Wirkung auch auf andere ubiquitäre Bakterien, besonders auf Angehörige der normalen Bodenflora, zu untersuchen. Der Einfachheit halber wählten wir eine Methode an, für die als Bezeichnung „Bio-Spektrogramm“ vielleicht zuträfe. Es handelt sich dabei kurz um folgendes:

Man bestimmt das Volum des aus einer gewogenen (Wurzel-)Probenmenge hergestellten Extraktes, so daß man die Frischgewichtsmenge je ml Auszug kennt. Nach Einsaugen in das Chromatogrammpapier

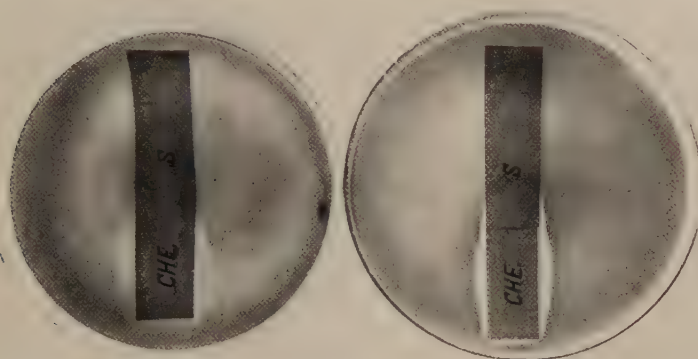


Abb. 5. Bio-Spektrogramme: Wirkung der Chelerythrin- und Sanguinarin-Zone auf zwei Bodenbakterien, links: *Proteus vulg.*, rechts: *Bac. mesentericus*; nur CHE hemmt, bei *Proteus* diffus, bei *Mesentericus* aber scharf begrenzt

wird das Restvolum des Extraktes bestimmt. Durch Division durch die Streifenbreite ergeben sich annähernd die Stoffmengen je 1 cm Chromatogrammbreite. Das fertige, sorgfältig getrocknete Chromatogramm wird nun in 1 cm breite, alle Zonen umfassende Längsstreifen zerlegt und (bei großer Länge gegebenenfalls geteilt) auf Dichtsaaagarplatten des zu prüfenden Organismus aufgebracht. Nach 2—3 Tagen Kultur im Brutschrank findet man in der Umgebung der Hemmstofforte mehr oder minder große wuchsfreie Höfe, oder es ist der Aufwuchs auf der ganzen Platte diffus vermindert. Auch Übergänge finden sich, wie aus Abb. 5 hervorgeht, welche eine scharfbegrenzte Hemmzone bei *Bac. mesentericus* und eine mehr verlaufende bei *Proteus vulgaris*, hervorgerufen durch Chelerythrin, zeigt<sup>1</sup>.

In allen nun beschriebenen Versuchen wurden 1 cm breite Streifen verwendet, welche die Stoffe von  $\frac{1}{10}$  g Frischgewicht des *Chelidonium*-Rhizoms enthielten; wegen seiner Länge wurde jeder Streifen in 3 Teile zerlegt, die auf Dichtsaaen entsprechender Bakterien auf Cenovis-Pepton-Agar kurz nach der Beimpfung aufgelegt wurden. Tab. 8 zeigt

<sup>1</sup> Die Aufnahmen wurden von Herrn ERNST KRAUSE am Botanischen Institut München in dankenswerter Weise durchgeführt.

das Ergebnis nach 2 Tagen bei 28° C, (zum Vergleich bringt Abb. 6 das Verhalten von 3 Az.-Stämmen). Geprüft wurden: *Bac. subtilis* und *mesentericus*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Mycobacterium phlei*, *Serratia marcescens*, *Micrococcus aurantiacus*, *Sarcina flava*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas pyocyanea*.

Tabelle 8. Wirkung der einzelnen Zonen des *Chelidonium*-Chromatogrammes auf verschiedene Bakterien\* (Dichtsaaten auf Cenovis-Pepton-Agar, 2 Tage bei 28° C)

Testorganismus	Hemmhofbreite		
	Berberin	Chelerythrin	Sanguinarin
<i>Bac. mesentericus</i> .	—	5 mm, scharf begrenzt	—
<i>Bac. subtilis</i> . . .	—	2 mm, scharf begrenzt	—
<i>Escherichia coli</i> . .	—	1 mm, deutlich	—
<i>Micrococcus aurant.</i>	2,5 mm, scharf begrenzt	5 mm, scharf begrenzt	—
<i>Proteus vulgaris</i> .	—	etwa 6 mm, diffus	—
<i>Sarcina flava</i> . . .	—	6,5 mm, scharf begrenzt	—

\* *Pseudomonas pyocyanea*, *Staphylococcus aureus* und *Mycobacterium phlei* zeigten allgemeine, diffuse Hemmung; *Aerobacter aerogenes* und *Serratia marcescens* wurden im Wachstum überhaupt nicht beeinflusst.

Die 3 Az.-Stämme (*ATCC 4412*, *Chelid. I* und *BLK 1*; vgl. Abb. 6, 1—3) waren empfindlicher als die anderen untersuchten Bakterien: die Hemmungen durch Berberin und besonders Chelerythrin sind sehr ausgesprochen; Sanguinarin wirkte schwach. Bei *BLK 1* finden wir wieder das allgemein geschwächte, diffuse Wachstum. Die übrigen Bakterien ließen, sofern sie überhaupt reagierten, vor allem die Giftigkeit des Chelerythrins erkennen, was mit den übrigen Befunden dieser Arbeit in gutem Einklang steht. Keinerlei Hemmung über die Gesamtlänge des Chromatogramms zeigten *Aerobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*; eine schwach angedeutete Hemmung (1—2 mm) in der Chelerythrinzone allein wiesen *Bac. subtilis* und *Escherichia coli* auf. *Sarcina flava* zeigte in der gleichen Zone einen wuchsfreien Hof von etwa 6 mm Breite, *Micrococcus aurantiacus* einen solchen von 5 mm und in dem Bereich des Berberins eine rund 3 mm breite Hemmung. Eine deutliche, sehr scharf abgegrenzte und auf Chelerythrin beschränkte wachstumsfreie Zone finden wir bei *Mesentericus*, nicht ganz so scharf und auch schon in dem Zwischengebiet gegen Berberin zu angedeutet bei *Proteus*. *Pseudomonas pyocyanea* und *Mycobacterium phlei* waren im ganzen Bereich und auf der ganzen Platte im Wachstum zurückgeblieben, die letztgenannte Gattung aber wies nur im Sanguinarinbereich, scharf gegen das stark hemmende Chelerythrin abgesetzt, einen deutlichen Bewuchs der Platte auf. Diese diffuse Schwächung teilen die letztgenannten Formen mit Az. *BLK 1*.



Wir können aus diesen Befunden RUSCHMANN beipflichten, der in *Az.* einen empfindlichen Testorganismus sieht; unter den übrigen, ziemlich wahllos herausgegriffenen Formen allgemein verbreiteter nicht pathogener Formen gibt es solche, die Schöllkraut gegenüber unempfindlich sind und solche, bei denen eine Berberin- und meist noch deutlicher und häufiger eine ausgesprochene Chelerythrin-Empfindlichkeit besteht. Das

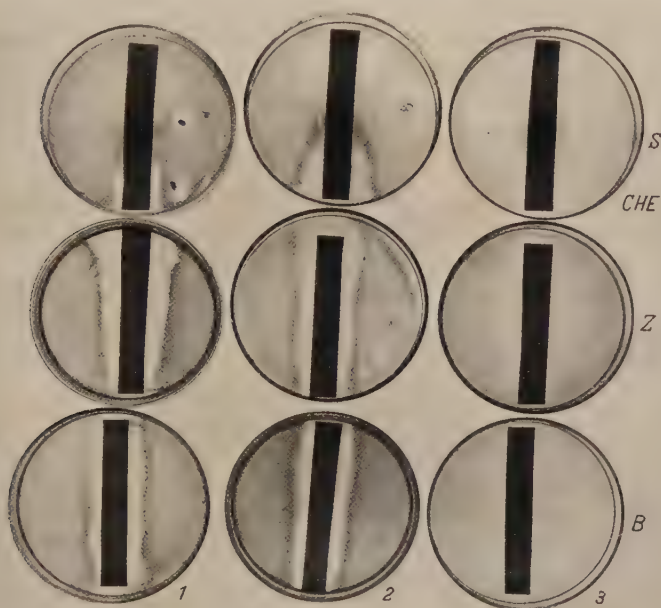


Abb. 6. Testung der einzelnen Komponenten des *Chelidonium*-Auszuges auf Wachstum verschiedener *Azotobacter*-Arten. Chromatogramm auf 3 Schalen verteilt: B Berberin, Z Zwischenzone, CHE Chelerythrin, S.Sanguinarin.

Organismen: 1 *Az. chrooc.* (*Chelid.*), 2. *Az. chrooc.* (ATCC 4412), 3. *Az. vinelandii* (BLK 1)

Sanguinarin ist den meisten Formen gegenüber recht harmlos. Beachtenswert scheint mit der Befund, daß zwei fakultativ pathogene Formen (*Pseudomonas pyocyanea* und *Staphylococcus aureus*) durch *Chelidonium* eine ausgeprägte Hemmung erleiden; es wären hier sicher recht interessante Untersuchungen mit Krankheitserregern anzuschließen. Es erscheint durchaus denkbar, daß die altberühmte Heilwirkung des Schöllkrautes (es wird u. a. von PARACELSUS, HIER. BOCK und in anderen mittelalterlichen Schriften als heilkräftig gegen Haut-, Leber- und Gallenleiden, sogar gegen Malaria gepriesen) wenigstens teilweise auf seinen Alkaloidgehalt im Sinne einer Bakterienhemmung, nicht bloß als Schmerzlinderungsmittel, zurückgeht.

### Zusammenfassung der Hauptergebnisse

1. Es wurden Bakterienhemmstoffe aus den Wurzelstöcken von *Chelidonium majus*, *Sanguinaria canadensis* und *Hydrastis canadensis* zu fassen versucht.

2. Nach Entwicklung neuer, papierchromatographischer Trennverfahren, die eingehend beschrieben werden, konnten als wirksame Stoffe die Alkaloide Berberin, Chelerythrin und in geringerem Ausmaß auch Sanguinarin festgestellt werden.

3. Diese Stoffe gelangen, wenigstens teilweise, auch aus der unverletzten Wurzel in den Boden und vermögen *Azotobacter* aus der engeren Rhizosphäre des Schöllkrautes fernzuhalten. Die einzelnen geprüften *Az. chroococcum* und *vinelandii*-Stämme sind allerdings unterschiedlich empfindlich.

4. Konzentrationen über 1:10000 schränken bei den meisten *Az.*-Formen Zellvermehrung und Stickstoffbindung sehr erheblich ein. Chelerythrin wirkt in der Regel giftiger als Berberin.

5. Als Angriffspunkt der Hemmstoffe innerhalb der Zelle werden auf Grund fluoreszenzmikroskopischer Befunde die Chondriosomenäquivalente angesehen; selektive Speicherung der Alkaloide an diesen Organellen dürfte zur Blockierung lebenswichtiger enzymatischer Vorgänge führen.

6. Andere, ubiquitär oder im Boden vorkommende Bakterien sind zumeist weniger gegen die Schöllkrautinhaltsstoffe als *Az.* empfindlich; doch finden sich in einigen Fällen Hemmungen durch Berberin, noch häufiger und ausgesprochener durch Chelerythrin. Dies wird an einer einfachen Schnellprüfmethode dargetan.

### Literatur

- BUKATSCH, F.: Z. ges. Naturwissensch. **1941**, 288 (1941) — Rapports du 8<sup>ème</sup> Congr. de Bot., Paris, Sect. XXI, 17 (1954). — Naturwiss. Rsch. **8**, 145 (1955). — BUKATSCH, F., u. J. HEITZER: Arch. Mikrobiol. **17**, 79 (1952). — DECKERS, W., u. J. SCHREIBER: Naturwissenschaften **40**, 53 (1953). — FLOETHMANN, E.: Arch. Mikrobiol. **20**, 243 (1954). — GADAMER, J.: Apoth. Ztg. **39**, 1569 (1924a). — GADAMER, J., u. A. STICHEL: Arch. Pharmaz. **262**, 488 (1924b). — HENRY, TH. A.: Plant Alkaloids, 4. Aufl., Churchill, London 1949. — KRIEG, A.: Naturwissenschaften **41**, 147 (1954). — METZ, H.: Arch. Mikrobiol. **23**, 297 (1955). — POSCHENRIEDER, H.: Zbl. Bakter. II, **80**, 369 (1930). — RUSCHMANN, J.: Pharmazie **7**, 5 (1952). — STRUGGER, S.: „Fluoreszenzmikrosk. u. Mikrobiol.“ 132 (Hannover, 1949).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

## Beobachtungen zum nicht-lytischen und lytischen Verhalten von Myxobakterien gegenüber anderen Mikroorganismen\*

Von

KÄTHE MEYER-PIETSCHMANN

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 10. Februar 1956)

Aus zahlreichen Arbeiten (VAHLE, PINOY, JAHN, BEEBE, SINGH, OETKER, NORÉN und anderen Forschern) wurde bekannt, daß *Myxobakterien* in festen und flüssigen Kulturen sowohl lebende wie abgetötete Bakterien auflösen und nach der meist danach erfolgenden Vermehrung (oft begleitet von Fruchtkörperbildung) zu urteilen, als Nahrungsquelle verwerten können. Über die Art der ökologischen Beziehung herrschen verschiedene Meinungen.

BEEBE vertritt die Ansicht, daß es sich um Parasitismus der Myxobakterien auf Eubakterien handelt. IMSENECKI und KUSJURNA (zit. nach NORÉN) halten die Beziehung zwischen Myxobakterien und Eubakterien für Saprophytismus, während KÜHLWEIN (1950) sie als Symbiose bezeichnet, bei der Bakterien, *Myxomyceten* und höhere Pilze als Partner auftreten können. In einer späteren Arbeit (KÜHLWEIN 1955) vermutet er, daß die lytische Aktivität der Myxobakterien vielleicht nur ein „Notphänomen“ in der Monokultur von Myxobakterien mit einem bestimmten Futterbakterium darstelle, während sie an den natürlichen Standorten (Erde, Losung) wegen der dort verfügbaren Stoffwechselprodukte lebender Begleitorganismen sicher nicht besonders hervortrete. NORÉN hebt hervor, daß Außenfaktoren, z. B. das pH, die gebotenen Nährstoffe usw. die Produktion der „bakteriolytischen“ Substanz in Fütterungsversuchen nach SINGH beeinflussen könnten. Sie wird auch ohne Gegenwart von Eubakterien gebildet (OXFORD, NORÉN 1953a), ob auch in rein synthetischen Nährmedien ist noch nicht gesichert. Die bakteriolytische Substanz ist in zellfrei gemachter Kulturlösung enthalten, ebenso die antibiotische Substanz. Die bakteriolytische Substanz wirkt nicht antibiotisch, wie NORÉN (1953b) nachwies. OXFORD konnte bei zwei Stämmen von *Myxococcus virescens* in dem einen eine Gelatinase, in dem anderen eine antibiotische Substanz nachweisen, während NORÉN beide Substanzen in ein und demselben *Myxococcus virescens*- bzw. *Chondrococcus coralloides*-Stamm fand (1953b). Daß Myxobakterien antibiotisch wirksam sein können, erwähnt FINCK auf Grund von Beobachtungen an Rohkulturen. Das Auffinden der bakteriolytischen Aktivität und antibiotischer Substanz hat zu der Vorstellung geführt, daß die Myxobakterien lebende Eubakterien durch das Antibioticum abtöten und sie dann mit Hilfe des proteolytischen Enzyms auflösen und als Nahrungsquelle verwerten. Abgetötete Futter-

\* Herrn Professor Dr. ALFRED KÜHN zum 70. Geburtstag gewidmet.



bakterien bedürften also nur der Auflösung durch das proteolytische Enzym. In OETKERS Fütterungsversuchen war das Wachstum der Myxobakterien jedoch stets besser mit lebenden als mit abgetöteten Eubakterien.

Unsere Kenntnisse über das bakteriolytische Vermögen von Myxobakterien sind vorwiegend an Fütterungsversuchen gewonnen (BEEBE, SINGH, OETKER). Meist wurden die Myxobakterien-Fruchtkörper gleichzeitig oder unter Zeitvorgabe für die Futterbakterien auf Eubakterien-ausstriche auf Nähragar oder Wasseragar gebracht. Oder Eubakterien-Suspensionen wurden mit Agar versetzt und autoklaviert.

NORÉN (1953a) hat den Vorgang der Lyse photometrisch verfolgt. Zu Aufschwemmungen von *Staphylococcus aureus* in Aqua dest. gab er die Myxobakterien selbst oder eine zellfreie Kulturlösung und maß den Gang der Lyse photometrisch, wobei er 3 Phasen feststellte. Daß die Myxobakterien nicht nur Bakterieneiweiß zu ihrer Ernährung verwerten, sondern auch *Hefen*, *Algen* und niedere Pilze (einen *Phycomyceten*) angreifen können, ist von OETKER nachgewiesen worden; für die Algen von Flechten (NORÉN nach vorläufigen Versuchen) und von KONONENKO (zit. nach NORÉN 1953a) für Pilze ist gezeigt worden, daß sie durch Myxobakterien ebenfalls verwertet werden können. Es ist also richtiger, mit OETKER von proteolytischen Enzymen zu sprechen statt von bakteriolytischer Substanz. OETKER wies auch darauf hin, daß die lytischen Erscheinungen in den Fütterungsversuchen in Parallelen verschieden ausfallen können. Den Eindruck von der quantitativen Verschiedenheit hat man auch bei Betrachtung der Abbildungen in den Arbeiten anderer Autoren. Während in manchen Fällen der Ausstrich der Futterbakterien von den Myxobakterien ganz aufgezehrt wird (OETKER Abb. 9), wird er in anderen Fällen nur teilweise zum Verschwinden gebracht, und oft wächst der Myxobakterienschwarm weit über die Futterquelle auf den Agar hinaus. Dies zeigen Abb. 1, 2, 7 und 8 von OETKER und Abb. 1, 2 und 4 von BEEBE. Das gleiche Verhalten kann man beobachten, wenn man einen Fruchtkörper von Myxobakterien, mit dem ja meist einige Begleitorganismen von der Lösung her mit übertragen werden (z. B. Bakterien, Pilze, Actinomyceten, Amöben) in die Mitte einer Lösungsdekotplatte bringt, ein Verfahren, das meist eben durch das expansive Wachstum zur Reinigung der Myxobakterien, zumindest der Myxokokken (z. B. BEEBE) führt. Andererseits können Myxobakterien von schneller wachsenden Begleitorganismen überwuchert werden (BEEBE) oder mit ihnen zusammen weiterwachsen, ohne Lyse-Erscheinungen zu zeigen, wie es z. B. KÜHLWEIN (1955) schildert.

Bei Verwendung von Eubakterien-Suspensionen offenbart sich die Lyse durch eine Aufhellung des Nährbodens unter dem Myxobakterienschwarm („window“ BEEBE, Abb. 17 und 18). KÜHLWEIN (1955) empfiehlt die Benutzung von Kiesel-säuregel mit Futterbakterien für die Beobachtung der Lyse als besonders geeignet wegen der Entstehung sehr klarer Lysiszonen.

Ebenso wie das Verhalten der Myxobakterien gegen Eubakterien verschieden ist, variiert es offenbar auch gegen andere Begleitorganismen, z. B. *Amöben* und *Pilze*.

In einem Fütterungsversuch *Chondromyces crocatus* mit *Dictyostelium mucoroides* beobachtete KÜHLWEIN (1950) die Fruchtkörperbildung des Myxobakteriums seitlich in halber Höhe am Fruchtkörperstiel des Myxomyceten. KÜHLWEIN wertet diesen Befund als eindeutigen Beweis für die symbiontische Lebensweise von *Chondromyces crocatus*. Es ist aber an den Fruchtkörperbildungen auf Lösung, die man in einer feuchten Kammer aufgestellt hat, oder auch auf infizierten Rohkultur-Petrischalen zu beobachten, daß die Myxobakterien ihre Fruchtkörper mit Vorliebe

an erhöhten Stellen anlegen, z. B. auf den Perithezien von *Ascobolus* und *Chaetobolus* (MEYER-PIETSCHMANN 1951 b), auf herausragenden festen Gras- oder Holzpartikelchen auf Wildlösung. JAHN beschreibt die Fruchtkörperbildung von *Chondromyces crocatus* auf Maiskörnern, die trotz Abkochen in Gärung übergegangen und von Schleim überzogen waren. Der Myxobakterienschwarm ging auf diese Körner über und bildete dort besonders große Fruchtkörper. Auf Petrischalen findet man Fruchtkörper auf Fremdkolonien oder am Rande, wo sich Kolonie und Schwarm berühren und eine Art Wulst bilden, oder auf Luftblasen, die den Agar etwas vorwölben. Der Schluß auf eine Symbiose erscheint daher nicht gerechtfertigt. Es ist recht zweifelhaft, ob dieses Heraufklettern der vegetativen Formen auf erhöhte Punkte unter Umwandlung in Mikrocyten und Fruchtkörperbildung mit Lyse oder Ernährung (JAHN) etwas zu tun hat. NORÉN (1953a) wies übrigens mit Aufschwemmungen nach, daß die von ihm untersuchten Mikrocyten nicht zu Lyse befähigt waren, im Gegensatz zu den zugehörigen vegetativen Formen.

KÜHLWEIN (1955) hat ein Bild von einer Rohkultur von *Chondromyces apiculatus* auf Wildkaninchenmistagar gegeben und mit der Erläuterung versehen „Schwarmfront von *Chondromyces apiculatus* Thaxter(?) auf Wildkaninchenmistagar. Zahlreiche encystierte Amöben vor, auf und hinter dem *Chondromyces*-Schwarm“. Hier gedeihen die vegetativen Stäbchen von *Chondromyces crocatus* in Gegenwart encystierter Amöben. Sie waren nach längerem Verweilen in der Gemeinschaft mit den Myxobakterien lebensfähig geblieben, denn sie schlüpften auf neuem Nährboden aus ihren Cysten. Daß Amöben nicht durch Myxobakterien geschädigt wurden, beobachtete auch SINGH. Die Beziehung zwischen Amöben und Myxobakterien kann sich aber auch anders gestalten.

Im folgenden wird ein solcher Befund geschildert, der bei einer Rohkultur von *Myxococcus rubescens* erhoben wurde. Von Rotwildlösung war ein Fruchtkörper in die Mitte einer Agarplatte mit Lösungsdekot gesetzt. Die Myxobakterien bewegten sich von der Plattenmitte aus nach allen Seiten im typischen kreisrunden Wachstum (im Bildausschnitt (Abb. 1) von links nach rechts). Es folgt ihnen eine Front von Amöben, die schon fast den vordersten Wachstumsrand erreicht haben, während an einer anderen Stelle noch mehr Bakterienwanderzüge des Schwarms rechts von den Amöben zu sehen sind. Zwischen den Amöben und links hinter ihnen sind keine Myxobakterien mehr zu erkennen; sie haben den Amöben als Futter gedient. Hier gedeihen die Amöben auf Kosten der Myxobakterien; in dem von KÜHLWEIN geschilderten Fall sind die Amöben in Gegenwart der Myxobakterien encystiert, vor und hinter dem *Chondromyces*-Wall. KÜHLWEIN schreibt dazu (1955, S. 302): „Die starke Vermehrung der Amöben unter dem Einfluß der *Myxobakterien* deutet auf sehr enge stoffwechselphysiologische Beziehungen. Diese sind sicher nutritiver Art, doch scheint andererseits auch ein Prinzip vorzuliegen, das die Amöben unter dem Einfluß der Myxobakterien zu erhöhter Encystierung veranlaßt.“ In Rohkulturen wurden wiederholt einzelne Amöben zwischen Myxobakterien und Begleitorganismen beobachtet, aber ein solch geschlossener Angriff der Amöben auf den schon weit vorgedrungenen sauberen Myxobakterienschwarm wurde nur im vorliegenden Fall beobachtet.

Daß sich die Beziehungen zwischen Amöben und ihren Futterbakterien (z. B. *Vahlkampfia tachypodia* Gläser und *Escherichia coli*) umkehren können, wurde vor Jahren bei dem Versuch, *Vahlkampfia* mit *E. coli* bei 25—32° C anstatt bei Zimmertemperatur zu züchten, festgestellt. Während bei Zimmertemperatur die Colibakterien durch die wachsende Amöbenkultur als Futter verwendet wurden, überwucherten und schädigten die Colibakterien die Amöben bei den höheren, dem

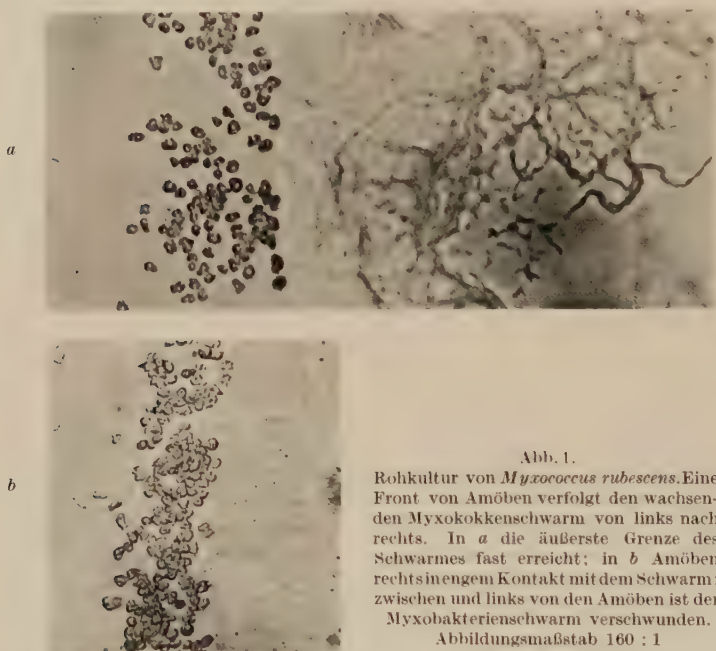


Abb. 1.

Rohkultur von *Myxococcus rubescens*. Eine Front von Amöben verfolgt den wachsenden Myxokokkenschwarm von links nach rechts. In *a* die äußerste Grenze des Schwarmes fast erreicht; in *b* Amöben rechtsinengem Kontakt mit dem Schwarm; zwischen und links von den Amöben ist der Myxobakterienschwarm verschwunden.

Abbildungsmaßstab 160 : 1

Bakterienwachstum günstigeren Temperaturen (PIETSCHMANN 1929). Mit *B. megaterium* gelang die Züchtung bei der höheren Temperatur ohne Schädigung der Amöben.

Die Vertilgung der Myxobakterien durch die Amöbe geschieht wohl, wie immer, durch die Aufnahme mittels Pseudopodien. Die Amöbenfront ist in unmittelbarem Kontakt mit dem Myxobakterienschwarm.

Weiterhin sollen einige Mikrophotogramme den Angriff von Myxobakterien auf kleine Eubakterienkolonien zeigen. Es handelt sich hierbei nicht um Fütterungsversuche, sondern um Zufallsbefunde. Mit dem Mikromanipulator waren Einzell-Kulturen von Mikrocyten von *Chondrococcus* (*Myxococcus*) *coralloides* auf Faulagar mit Lösungsdekot hergestellt worden. Das Wachstum einer Einzell-Kultur erfolgt sehr langsam (etwa eine Zellteilung innerhalb 24 Std unter den gewählten Bedingungen), und



da ein solcher Hängetrophen erst in etwa 2—4 Wochen von der sich entwickelnden Kultur überwandert wird, ist die Gefahr einer nachträglichen Infektion, z. B. auf dem Wege über Kondenswasserbrücken, die sich vom Umrandungswasser her bilden können, sehr groß. Bei dem vorliegenden Präparat, das beim Photographieren 14 Tage alt war, war eine Infektion des Agartropfens in der Randzone durch ein winziges Bakterium, das nicht näher bestimmt wurde, wohl aber zur *Fluorescens*-Gruppe gehören könnte, aufgetreten. Bald wurden die Kolonien, die erst eine deutliche runde Begrenzungslinie zeigten, von den von der Tropfenmitte zum Tropfenrande wandernden Myxobakterien aufgefunden und angegriffen, so daß der Rand aufgelockert und ausgefranst erschien. Innerhalb von 15—20 min war die Auflockerung bereits bis etwa zur Mitte der Kolonie fortgeschritten und eine weitere Anzahl von Myxobakterien zugewandert. Leider sind die beiden Hellfeldaufnahmen für die Wiedergabe im Druck nicht geeignet; die eingedrungenen Myxobakterien sind ohne Lupe infolge Kontrastmangels nicht deutlich genug zu erkennen, und die Kondenswassertropfen im Hohlsliffobjektträger beeinträchtigten das Bild im Ganzen stark gegenüber der visuellen Beobachtung. Es fanden sich in dem gleichen Präparat am Tropfenrande noch mehrere angegriffene Eubakterienkolonien. Sie weisen helle, meist etwas gebogene Gänge auf, die die Myxobakterien meist von einer Seite, gelegentlich auch von zwei gegenüberliegenden Seiten her wie „Fraßspuren“ beim Eindringen und Durchwandern hinterlassen haben.

Die Myxobakterien außerhalb des Bereichs der Kolonie scheinen nicht so zielstrebig, wie sie es bei Luftblasen im Agar tun können (MEYER-PIETSCHMANN 1951 b), auf die Eubakterien wie auf einen Köder, zuzukriechen. Andererseits wird von OETKER berichtet, daß ihr die Gewinnung von *Myxococcus fulvus* und *virescens* aus Bodenkrümeln auf Platten mit nährstofffreiem Agar, auf dem Futterbakterien „als Köder“ ausgestrichen waren, gelang. Im übrigen wandern aber die Myxobakterien sowohl in Rohkultur von den Begleitorganismen, als auch in Fütterungsversuchen vom Impfstich mit dem starken Eubakterienwachstum fort. Das geschieht nicht nur auf Losungsdekot- oder Kartoffeldekotagar, der ihnen ja allein genug Nährstoffe bietet, sondern auch auf reinem Wasseragar, welcher bekanntlich einigen Myxobakterien allerdings auch schon ein schwaches Wachstum ermöglicht. Wahrscheinlich machen sie abgelagerte Reservestoffe von der Nahrungsquelle zeitweilig unabhängig. Die Ausbreitung von der Impfstelle aus, von der Platten- oder Tropfenmitte oder von dem Bodenkrümel aus entspricht einer bestimmten Tendenz. Dies kann nicht wie bei Eubakterien mit einem „Wachstumsdruck“, der sich infolge fortgesetzter Teilungen entwickelt, erklärt werden; es ist eher dem Ausschwärmen begeißelter Bakterien zu vergleichen, wenn dieses auch nicht ein so gleichmäßiger Vorgang ist, wie die Myxobakterien-Bewegung über das Substrat, bei der eine Zellvermehrung stattfindet.

Abb. 2a—c zeigt den Beginn und das allmähliche Fortschreiten des Eindringens der Myxobakterien in andere Eubakterienkolonien des gleichen Hängetrophenpräparates wie oben. Die Aufnahmen wurden 2 Tage später im Phasenkontrast gemacht, nachdem der Kondenswasserbeschlag im

Hohlsliff des Objektträgers entfernt und der Hohlsliff zur Verhütung erneuten Beschlagens mit einem Stift ganz dünn eingerieben war, wie er in der kalten Jahreszeit bei Brillengläsern verwendet wird. In Abb. 2a sind erst etwa 6—7 Myxobakterien in die Kolonie eingedrungen, oben links sind 2 Individuen bis an die erste dickere Zone vorgeschritten. Der schmale helle Gang deutet auf ein nacheinander erfolgtes Einwandern. Schräg links davon liegen noch ganz am Rande der Kolonie 2 Bakterien.

Von unten her ist in die Kolonie eine helle Bucht vorgetrieben, die bis zur Mitte der mittleren abgesetzten Zone der Kolonie reicht und an deren innerem Ende 2 Bakterien nebeneinander liegen, während am Eingang der

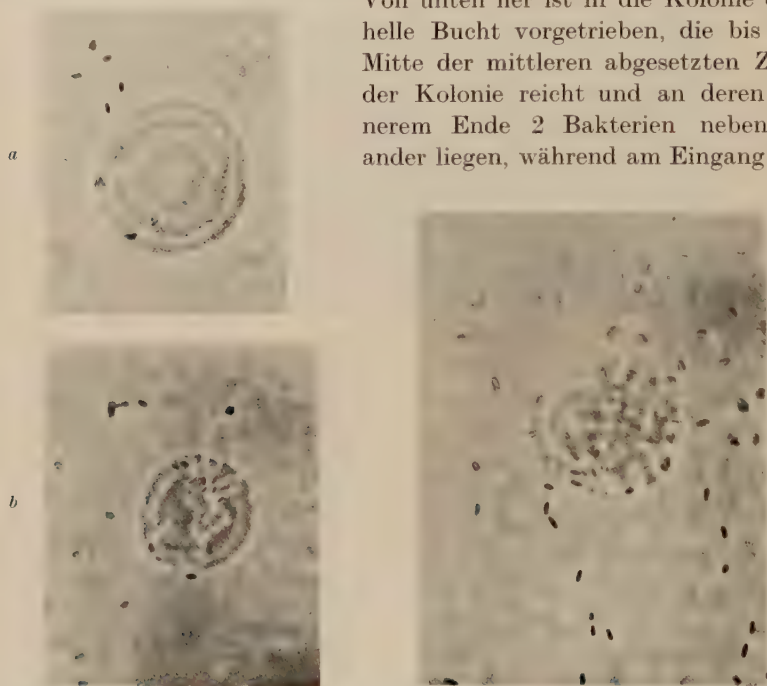


Abb. 2. Phasenkontrastaufnahmen von Eubakterienkolonien, die als Randverunreinigung eines Agarhängetropfens mit einer Einzel-Kultur von *Chondrococcus* (*Myxococcus*) *coralloides* auftraten. Die Myxobakterien dunkel gegenüber den helleren kleinen Eubakterien. a Beginnendes Eindringen der Myxobakterien in die Kolonie. Abbildungsmaßstab 480:1. — b Stärker angegriffene Kolonie. Verhältnismäßig wenige Bakterien haben eine deutliche lytische Wirkung hervorgebracht. Abbildungsmaßstab 460:1. — c Kolonie in zunehmender Auflösung. Unschärfe infolge zunehmender Tropfendicke nach der oberen Bildhälfte zu. Abbildungsmaßstab 480:1

Bucht links ein großes Myxobakterium im Begriff ist, einzudringen. Im Phasenkontrast heben sich die Myxobakterien durch ihr fast schwarzes Aussehen und ihre Größe deutlich von den winzigen Eubakterien in der Kolonie ab; diese erscheinen nur in den dicksten Koloniebereichen annähernd so dunkel wie die unscharfen helleren Myxobakterien.

Eine Kolonie anscheinend des gleichen Eubakteriums zeigt Abb. 2b. Sie ist schon mehr von den Myxobakterien durchwandert und dabei angegriffen. Etwa ein Dutzend Myxobakterien sind im Innern und am

Rande der Kolonie durch ihren dunklen Phasenkontrast kenntlich. An diesem Bilde wird deutlich, daß die hellen Gänge, die durch die Kolonie führen, nicht allein durch das Durchkriechen der Myxobakterien entstanden sein können. Wenn das der Fall wäre, müßten die Eubakterien an den Seiten der Kanäle aufgehäuft sein oder der Gang hinter dem Myxobakterium müßte sich wieder geschlossen haben. Die Eubakterienmasse wird auch nicht vor den Myxobakterien hergeschoben; die Gänge sind also nur als Folge der Auflösung der Eubakterien durch die durchwandernden Myxo-

bakterien in deren unmittelbarer Nachbarschaft zu deuten. Abb. 2c zeigt eine Kolonie im gleichen Präparat, die schon in starker Auflösung begriffen ist. Die Unschärfe der oberen Bildhälfte erklärt sich mit der zunehmenden Agartropfendicke in dieser Richtung. Im mittelsten Teil der Kolonie sind die Aufhellungen nicht als Gänge, sondern helle Flecke zu sehen. Zu beachten ist die verschiedene Größe der Myxobakterien, eine Folge erfolgter und bevorstehender

Teilungen. Außerdem ist hervorzuheben, daß die von der Kolonie zum Tropfenrande weiterwandernden Myxobakterien keine Eubakterienzellen mitgeschleppt, auch nicht den unteren Kolonierand deformiert haben, was zu erwarten wäre, wenn die Myxobakterien Schleim bildeten.

Bei der Beobachtung solcher Kolonien wie in Abb. 2a—c gewinnt man den Eindruck, daß die Myxobakterien, die sich von der Stelle, wo die Mikrocyte aufgebracht wurde, unter steter Vermehrung auf der Wanderung zum Tropfenrande befinden, wohl diese durch die zufällige Infektion gebotene zusätzliche Nahrungsquelle sozusagen mitnehmen, sich aber nicht lange dabei aufhalten, sondern weiterwandern. Aber durch nachfolgende Individuen (im oberen Bildteil bereits im Anmarsch!) wird die angegriffene Kolonie vollends zerstört.

Ähnliche Beobachtungen konnten, wie hier für *Myxococcus coralloides* beschrieben wurde, auch bei der Einwirkung von *Myxococcus rubescens* auf eine Bakterienkolonie mit nicht so terrassenförmigem Wachstum und glatterem Rand beobachtet werden. Diese Kolonie fand sich etwa

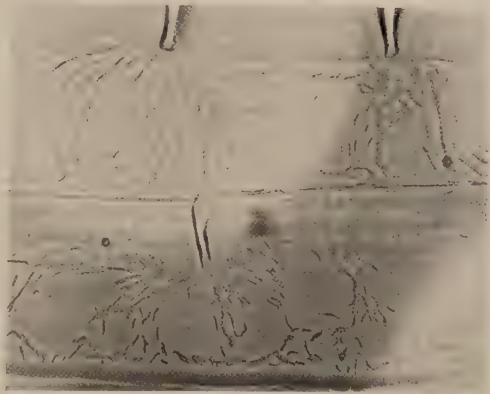


Abb. 3. Gefaltete Randpartie eines 4 Wochen alten Agarhängetropfens mit einer Einzellkultur von *Myxococcus rubescens*. In der Nähe der bereits vernichteten Eubakterienkolonie kriechen die Myxobakterien um die Agarfältchen herum zum Tropfenrand (am unteren Bildrand).

An den Fältchen deutliche *Elasticotaxis* (STANIER).

Abbildungsmaßstab 280 : 1



3 Wochen nach der Isolierung der Mikrocyte von *M. rubescens*. Die Myxokokken krochen in tangentialer Richtung an die Kolonie heran. Am folgenden Tage war sie bereits von Gängen durchzogen; sie erschien aufgelockert, in der Mitte beobachtete man Züge von Myxobakterien. Eubakterienzellen waren nicht mehr oder stellenweise nur eben noch zu erkennen. Am folgenden Tage war von der Kolonie nichts mehr mit Sicherheit auszumachen. Die Myxokokken hatten sich lebhaft vermehrt und wanderten dem Tropfenrande zu. Abb. 3 zeigt die am gefältelten Rand angekommenen Myxokokken. Sie umkriechen die Agarfältchen; der äußerste Tropfenrand befindet sich nahe dem unteren Bildrande. Eine Verschleppung der Eubakterien ist nicht erfolgt; die Kolonie wurde vielmehr restlos vernichtet. Diese Beobachtungen an *Myxococcus rubescens* lassen sich ebenso wenig wie diejenigen an *Chondrococcus (Myxococcus) coralloides* mit einer Bildung von Schleim, der die zahlreichen Zellen zusammenhielt und zu ihrer Bewegung notwendig wäre, vereinbaren.

Vereinzelt fanden sich als Randverunreinigungen des *Coralloides*-Hängetropfens auch Hefekolonien, die von den Myxobakterien offenbar nicht angegriffen wurden. In OETKERS Fütterungsversuchen war das Verhalten der Myxobakterien gegenüber Hefen verschieden. OETKER hat ihrer Arbeit mikroskopische Bilder von der lytischen Wirkung von Myxobakterien auf Hefen und Algen beigegeben.

### Zusammenfassung

In einer Rohkultur von *Myxococcus rubescens* wurde der sich ausbreitende Schwarm von einer Amöbenfront verfolgt und dabei vernichtet.

An Phasenkontrastaufnahmen wird der Angriff von Myxobakterien — Einzell-Kulturen von *Chondrococcus (Myxococcus) coralloides* und *Myxococcus rubescens* auf Agarhängetropfen — auf zufällig als Randverunreinigung aufgetretene Eubakterienkolonien gezeigt.

Die Beobachtungen sprechen gegen eine Schleimbildung der Myxobakterienzellen.

### Literatur

- BEEBE, J. M.: Iowa State College J. of Science **15**, 307 und 319 (1941). — FINCK, G.: Arch. Mikrobiol. **15**, 358 (1950). — JAHN, E.: Beiträge zur botan. Protistologie I. Die Polyangiden. Leipzig: Bornträger 1924. — KÜHLWEIN, H.: Arch. Mikrobiol. **14**, 678 (1950). — Zbl. Bakter. I Orig. **162**, 296 (1955). — MEYER-PIETSCHMANN, K.: Arch. Mikrobiol. **16**, 163 (1951 a). — Mikrokosmos **41**. Jg. Heft 2, S. 27 (1951 b). — NORÉN, B.: Sv. bot. Tidskr. **47**, 309 (a) und 402 (b) (1953). — OETKER, H.: Arch. Mikrobiol. **19**, 206 (1953). — OXFORD, A. E.: J. Bacter. **53**, 129 (1947). — PIETSCHMANN, K.: Arch. Protistenkunde **65**, 381 (1929). — PINOY, E.: C. r. Acad. Sci. (Paris) **157**, 77 (1913). — Ann. Inst. Pasteur **35**, 485 (1921). — SINGH, B. N.: J. Gen. Microbiol. **1**, 1 (1947). — VAHLE, K.: Zbl. Bakter. II **25**, 178 (1910).

Ausgeführt mit Unterstützung durch die deutsche Forschungsgemeinschaft.

(Dept. of Biochemistry, The University of Liverpool, Liverpool, 3)

## The Carotenoids of Photosynthetic Bacteria

### I. The nature of the carotenoid pigments in a halophilic photosynthetic sulphur bacterium (*Chromatium* spp.)

By

T. W. GOODWIN and D. G. LAND

With 1 figure in the text

(Eingegangen am 12. März 1956)

Very little work has been carried out on the carotenoid pigments of pure cultures of the members of the *Thiorhodaceae*. LEVY, TEISSIER and WURMSER (1925) found  $\alpha$ -bacteriopurpurin in *Chromatium okenii*; this pigment is identical with bacterioerythrin  $\alpha$  (ARCHICHOVSKII, 1904), spirilloxanthin (VAN NIEL and SMITH, 1935) and rhodoviolascins (KARRER and SOLMSEN, 1935, 1936; spirilloxanthin is the name used in this paper). In a mass culture of *Thiocystis* spp. KARRER and SOLMSEN (1936) found, in addition to spirilloxanthin, rhodopin and rhodopurpurene; later KARRER and JUCKER (1950) state that rhodovibrin and  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes and flavorhodene are also present. As will be shown in this paper, rhodopin [= bacterioerythrin- $\beta$  (BUDER, 1919)] is almost certainly lycoxanthin; evidence also exists that rhodopurpurene is identical with lycopene, but in this case it is less direct. The one objection which can be levelled at the work of KARRER and SOLMSEN is that the mass cultures used "must have contained various representatives of the *Thio*- and *Athiorhodaceae*" (VAN NIEL, 1944).

The present work represents the first recent investigation into the pigments of a pure culture of a purple sulphur bacterium.

### Experimental

**Cultures.** The *Chromatium* sp. used was that kindly provided by Mr. K. R. BUTLIN (Chemical Research Laboratories, D. S. I. R., Teddington, Middlesex) and isolated from a Cyrenaican sulphur producing lake at Ain-ez-Zauia. *Phycomyces blakesleeana* and *Rhodospirillum rubrum* required for reference carotenoids were the strains used in previous investigations in this Department (GOODWIN, 1952; GOODWIN and OSMAN, 1953, 1954).

**Media.** The medium used for the *Chromatium* sp. is that recommended by BUTLIN (private communication). The basic salt medium, sterilized by autoclaving (15 lb./sq. in. 30 min.) contained (per 93 ml.),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 g.;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.1 g.;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.05 g.;  $\text{CaCl}_2$ , 0.01 g.;  $\text{NaCl}$ , 2.5 g.;  $\text{Fe}^{3+}$  (as  $\text{FeCl}_3$ , 6  $\text{H}_2\text{O}$ ), 50  $\mu\text{g}$ .;  $\text{B}$  (as  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), 10  $\mu\text{g}$ .;  $\text{Zn}$  (as  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), 10  $\mu\text{g}$ .;  $\text{Co}$  [as  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ], 5.0  $\mu\text{g}$ .;  $\text{Cu}$  (as  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), 0.5  $\mu\text{g}$ .;  $\text{Mn}$  (as  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 0.5  $\mu\text{g}$ . (The micro constituents were added from a concentrated stock solution). The following were then added immediately

before use to make the final volume 100 ml.: 1 ml. 10% (w/v)  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ; 4 ml. 5% (w/v)  $\text{NaHCO}_3$ ; 1 ml. 10% (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . The  $\text{NaHCO}_3$  solution was sterilized by filtration, the others by autoclaving. If necessary, the pH of the medium was finally adjusted to 8.5.

The media used for *Rsp. rubrum* and *P. blakesleeanus* were those previously described by GOODWIN and OSMAN (1953) and GARTON, GOODWIN and LIJINSKY (1951) respectively.

"Diphenylamine media" were made up using an aqueous solution of diphenylamine (1:70.000) instead of water as the solvent (GOODWIN, 1952).

*Cultural conditions.* The *Chromatium* sp. and *Rsp. rubrum* were cultured at 30° in a glass incubator (GARTON et al., 1951) illuminated on two sides by 4 × 60 W Tungsten filament lamps (GOODWIN and OSMAN, 1953). *Ph. blakesleeanus* was cultured at 25° in a similar incubator but without artificial illumination.

*Source of authentic lycoxanthin.* Lycoxanthin was obtained from the pigment extract of the berries of *Solanum dulcamara* (ZECHMEISTER and CHOLNOKY, 1936) gathered in Wirral, Cheshire during August 1955.

*Extraction of pigments.* The pigments were extracted from *Ph. blakesleeanus* and *Rsp. rubrum* by the methods of GOODWIN (1952) and GOODWIN and OSMAN (1953), respectively. This latter method was also applied to the extraction of *Chromatium* sp. with the slight modification that the bacterial mass after grinding under methanol was allowed to stand in the solvent for  $\frac{1}{2}$ —1 hr. before centrifuging; this step was repeated once. With *Rsp. rubrum*, one methanol extraction is sufficient and the cells are centrifuged immediately after grinding with methanol. The pigments were extracted from *S. dulcamara* using the method of GOODWIN (1956a).

*Chromatography of pigment extracts.* The pigments were separated and purified by chromatography on activated alumina (Grade "O"; Peter Spence and Co. Widnes), alumina deactivated with methanol (GOODWIN and SRISUKH, 1950), or an appropriate mixture of the two. The method of separation has been described previously (GOODWIN, 1952). Chromatography of lycoxanthin on  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ /Celite (3:1) and on  $\text{MgO}$ /Celite (2:1) columns was carried out as described by HAXO (1949) and by STARR and SAFERSTEIN (1953), respectively.

*Isomerization of pigments.* This was carried out with iodine using the method of ZECHMEISTER (1944).

Table 1. The  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  values of the polyenes present in *Chromatium* spp.  
(Used in calculating the relative amounts present)

Pigment	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	Reference
<i>P</i> 481 <sup>1</sup> . . . . .	2500	—
Lycopene . . . . .	3460	ZECHMEISTER (1944)
Spirilloxanthin . . . . .	2350	POLGÁR, VAN NIEL and ZECHMEISTER (1944)
Lycoxanthin <sup>2</sup> (3-hydroxylycopene) . . .	3460	—
Hydroxy- <i>P</i> 481 <sup>1</sup> (?) (Rhodovibrin) . . .	2500	—
Demethylated spirilloxanthin <sup>2</sup> . . . . .	2350	—
(?) Lycophyll <sup>2</sup> (3,3'-dihydroxylycopene)	3460	—

<sup>1</sup> True value unknown; assumed to be that of  $\beta$ -carotene.

<sup>2</sup> The values for these pigments are assumed to be the same as for the parent compounds.



*Preparation of methoxylycopene.* Lycoxanthin (1.5 mg.) was methylated according to the method of KARRER and TAKAHASHI (1933); yield, 0.2 mg. (methoxyl, found 5.0% approx., monomethoxylycopene requires 5.35%; this was one semi-quantitative determination to confirm presence of methoxyl).

*Quantitative experiments.* The relative distribution of the constituent carotenoids in *Chromatium* sp. was determined by dissolving each pigment fraction in a known volume of light petroleum (light petroleum, b. p. 40–60° was used throughout this investigation) and measuring the  $E(\lambda_{\max})$ ; knowing  $E_{1\text{cm.}}^{1\%}$  for the pure pigments, the amounts present then could be calculated. The  $E_{1\text{cm.}}^{1\%}$  values used are given in Table 1.

*Dry wt. determinations.* These were carried out on *Chromatium* sp. in a similar way to that described for *Phycomyces blakesleeana*s (GARTON et. al., 1951).

*Spectroscopic measurements.* These were carried out using a Unicam SP 500 or 600 instrument. Readings were made at intervals of 5  $m\mu$ ., except in the regions of maximal and minimal absorption, when the interval was reduced to 1  $m\mu$ .

## Results and Discussion

A typical chromatographic separation of *Chromatium* carotenoids is given in Table 2. Each fraction was rechromatographed until homogeneous and then examined in detail. Fraction 2 is almost certainly lycopene; its absorption spectrum in a number of solvents is identical

Table 2. *Chromatographic separation of carotenoids of a Chromatium sp.* (Adsorbent deactivated alumina; developer light petroleum containing varying amounts of ethyl ether; zones in order of increasing adsorptive power)

Zone No.	Description	Absorption spectrum maxima ( $m\mu$ .) in light petroleum	Concn. (% v/v) of ether required for elution	Provisional Identification
1	Yellow-orange	439, 465, 495	2	(?) <i>cis</i> -lycopene
2	Orange	443, 469, 501	2	Lycopene
3	Orange-pink	454, 481, 514	12–15	New pigment ( <i>P</i> 481)
4	Purple	463, 492, 525	25	Spirilloxanthin
5	Orange	443, 469, 500	25–30	Lycoxanthin (Rhodopin)
6	Pink	455, 480, 512	40	hydroxy- <i>P</i> 481 (? rhodovibrin)
7	Pink-purple	463, 491, 525	75	Demethylated spirilloxanthin
8	Orange-yellow <sup>1</sup>	441, 467, 497	100	(?) Lycophyll

<sup>1</sup> The zone is more easily eluted with light petroleum containing 2% (v/v) acetone.

with that of lycopene; it cannot be separated chromatographically from an authentic sample isolated from tomatoes. It is easily separable from methoxylycopene, which has the same absorption spectrum but which is more strongly adsorbed on alumina. On treatment with  $I_2$ , its absorption spectrum changes to that of the equilibrium mixture of *cis*-trans isomers obtained when authentic lycopene is  $I_2$ -isomerized (ZECHMEISTER, 1944).

The pigment rhodopurpurene, which KARRER and SOLMSEN (1936) obtained in traces from their *Thiocystis* cultures, "showed great similarity with lycopene" (KARRER and JUCKER, 1950). Our experiments with the very closely related *Chromatium* spp., would tend to confirm the identification of lycopene with rhodopurpurene.

Fraction 1, which occurs only in traces, is probably mainly a *cis* isomer of lycopene, for it has an absorption spectrum with slightly lower

absorption maxima and with reduced definition; it may also contain minute amounts of neurosporene.

Fraction 3 is a new pigment not described by KARRER and SOLMSEN (1936) but may be the pigment mentioned briefly by VAN NIEL and SMITH (1936) as occurring in the mother liquor of an extract of *Rsp. rubrum* after removing spirilloxanthin. It has been found recently in *Rsp. rubrum* and a number of other *Athiorhodaceae*

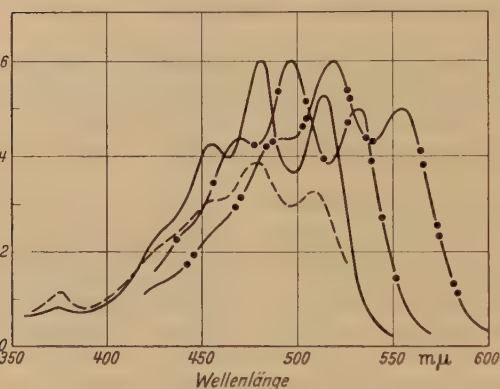


Figure 1. The absorption spectrum of P 481 in various solvents. 1 Light petroleum *a* before isomerization ———, *b* after isomerization ————; 2 Benzene — · — · —; 3 Carbon disulphide — · · · — · —

(GOODWIN and SISSINS, 1955; GOODWIN, 1956b). Until the pigment has been isolated crystalline and its structure elucidated, it is proposed to name it P 481 (481 mμ. being the position of its main absorption maximum in light petroleum). Its absorption spectrum in three solvents is given in Fig. 1, and the exact position of the maxima in five solvents in Table 3.

Table 3. The absorption maxima of Fraction 3 (Table 2) in various solvents

Solvent	Absorption maxima (mμ.)
Carbon disulphide . . . . .	492, 520, 558
Chloroform . . . . .	468, 494, 527
Benzene . . . . .	470, 497, 532
Light petroleum . . . . .	454, 481, 514
Ethanol . . . . .	455, 482, 514

Iodine isomerization tests show that P 481 is an all-*trans* carotenoid and not, as was a possibility, a *cis* isomer of spirilloxanthin. After I<sub>2</sub> treatment changes characteristic of an all-*trans* compound were observed (Fig. 1): a) a lowering of both extinction and wavelength, b) a reduction in the sharpness of the bands and c) the appearance of a *cis*-peak at a wavelength about 140 mμ. lower than that of the maximum of the longest wavelength band.

Fraction 4 is spirilloxanthin, being chromatographically and spectroscopically indistinguishable from an authentic sample obtained from

*Rsp. rubrum*. Traces of a mixture of *cis*-spirilloxanthin are always obtained and adsorbed just below spirilloxanthin; it is difficult to decide whether these are artifacts or not, for spirilloxanthin very easily isomerizes under the mildest manipulative treatment.

Fraction 5 is KARRER and SOLMSEN's rhodopin and appears to be indistinguishable from lycoxanthin, 3-hydroxylycopene, a pigment first isolated from the berries of *Solanum dulcamara* (ZECHMEISTER and CHOLNOKY, 1936). We have obtained a number of pieces of evidence to justify considering rhodopin and lycoxanthin identical: 1. the absorption spectra maxima in a number of solvents are almost identical (Table 4); 2. the shape of the spectrum of our pigment is identical with that of lycoxanthin extracted by us from *S. dulcamara* (ZECHMEISTER and CHOLNOKY did not record the shape of their absorption curve); 3. iodine isomerization of both pigments produces the same spectral changes; 4. chromatographically homogeneous specimens of the two pigments cannot be separated on columns of either alumina or MgO/Celite (2:1); 5. lycoxanthin (rhodopin) has been found as a constant constituent of a number of *Athiorhodaceae* (GOODWIN, 1956b) including *Rhodopseudomonas palustris* which is a synonym of *Rhodovibrio* and *Rhodobacillus* spp. (VAN NIEL, 1944) in which KARRER and SOLMSEN (1936) observed rhodopin; and 6. it is also clearly the same pigment as that observed by HAXO (1949) in *Neurospora crassa* and termed lycoxanthin or rhodopin, and by STARR and SAPERSTEIN (1953) in *Corynebact. poinsettiae* and termed lycoxanthin. HAXO's pigment is adsorbed above spirilloxanthin using  $\text{Ca}(\text{OH})_2/\text{Celite}$  as adsorbent and light petroleum/acetone as developer, whilst STARR and SAPERSTEIN's pigment is adsorbed below spirilloxanthin using MgO/Celite as adsorbent and light petroleum/acetone as developer. Both fraction 5 and authentic lycoxanthin when examined on these two adsorbents admixed with authentic spirilloxanthin behave in the way described by HAXO and by STARR and SAPERSTEIN for their pigments; 7. the possibility existed that fraction 5 differed from lycoxanthin in having its hydroxyl attached to  $\text{C}_4$  instead of  $\text{C}_3$ . By analogy with cryptoxanthin (3-hydroxy- $\beta$ -carotene) and isocryptoxanthin (4-hydroxy- $\beta$ -carotene), 3-hydroxy- and 4-hydroxylycopene would have identical absorption spectra and would either be not separable chromatographically or separable with only the greatest difficulty.

Differentiation is simple however, because the 4-hydroxy compound should react with  $\text{CHCl}_3$  containing HCl in the manner characteristic of carotenoids containing a  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}=\text{CH}-$  group; water is removed and a pigment with lower adsorptive affinity and absorption maxima at longer wavelengths than the parent compound is produced (WALLCAVE and ZECHMEISTER, 1953). Fraction 5 does not react with  $\text{CHCl}_3/\text{HCl}$  in



this way; 8. the possible identity of fraction 5 with methoxylycopene (VAN NIEL, 1944) was ruled out by chromatographie comparison with an authentic specimen of the latter. The two pigments were easily separable; for example, in one experiment, methoxylycopene was eluted with 4% (v/v) ether in light petroleum and fraction 5 with 15%.

Table 4. *A comparison of the absorption maxima (m $\mu$ ) of Fraction 5 (Table 2) with those of lycopanthin and rhodopin*

Solvent	Fraction 5	Lycopanthin <sup>1</sup>	Rhodopin <sup>3,4</sup>
Carbon disulphide . . . . .	476, 505, 544	472, 506, 546	478, 508, 547
Light petroleum <sup>2</sup> . . . . .	443, 469, 500	443, 472, 502	440, 470, 501
Benzene . . . . .	456, 484, 519	456, 487, 521	— — —
Chloroform . . . . .	455, 482, 516	— — —	453, 486, 521
Ethanol. . . . .	455, 470, 501	442, 473, 503	442, 470, 501

<sup>1</sup> ZECHMEISTER and CHOLNOKY (1936).

<sup>2</sup> Light petroleum (b. p. 60–80°) was used by ZECHMEISTER and CHOLNOKY; abs. maxima of carotenoids increase slightly in the higher boiling fractions.

<sup>3</sup> KARRER and SOLMSEN (1936).

<sup>4</sup> KARRER and WÜGLER (1943).

Fractions 6, 7 and 8 occur only in small amounts and have not been examined in detail. Fraction 6 appears from its adsorptive properties to be a monohydroxy carotenoid. This was confirmed by partition experiments; the pigment distributes almost equally between light petroleum and 95% methanol but is epiphasic to 90% methanol. It may be identical with KARRER and SOLMSEN's (1936) rhodovibrin. It has an absorption spectrum indistinguishable from *P* 481 and therefore must contain the same or a very similar chromophoric system; it is therefore designated here hydroxy-*P* 481 for convenience.

Fraction 7 is probably identical with the pigment observed in small amounts in *Rsp. rubrum* (GOODWIN and OSMAN, 1954) and tentatively identified as demethylated spirilloxanthin.

Fraction 8 closely resembles lycophyll (3,3-dihydroxy-lycopene) (ZECHMEISTER and CHOLNOKY, 1936); adsorptive properties and phase tests (hypophasic to 90% v/v aqueous methanol) indicate two free hydroxy groups and its spectrum is indistinguishable in position and shape from that of lycopene.

These results indicate that the general distribution of carotenoid pigments in *Chromatium* sp. is qualitatively similar to that found in all *Athiorhodaceae* except those which produce different carotenoids according to whether they are grown aerobically or anaerobically e. g. *Rhodopseudomonas spheroides* (GOODWIN, LAND and OSMAN, 1955; GOODWIN, 1956b). There is therefore nothing specially characteristic in the carotenoid distribution in this member of the *Thiorhodaceae*.

## Quantitative Experiments

The quantitative distribution in mature (5 day) cultures of *Chromatium* sp. is given in Table 5. It will be noted that lycoxanthin is the major component. There are no significant changes in this quantitative picture in old cultures (10 days and 4 weeks), but in one experiment it was observed that the percentage of lycoxanthin was increased and that of spirilloxanthin and *P* 481 reduced in a 40 hr. culture.

The total concentration of pigment (1.8 mg./g. dry wt.) is somewhat less than in *Rsp. rubrum* (3.5 mg./g. dry wt.) (GOODWIN and OSMAN, 1953) and in *R. sphaeroides* (2.5 mg./g. dry wt.) (GOODWIN et al., 1955).

Table 5. *The quantitative carotenoid distribution in Chromatium sp.*  
(Amounts produced per bottle (270 ml.); 5 day cultures; temp. 30°)

Total dry wt. (mg.) . . . . .	176.0, 158.7	
Lipid (mg.) . . . . .	35.6, 24.4	
% Lipid . . . . .	20.4, 15.4	
Pigments	Total amount present ( $\mu$ g.)	% of total pigments present
Lycopene . . . . .	20.2, 25.2	6.8, 7.2
<i>P</i> 481 . . . . .	39.2, 45.6	13.3, 13.1
Spirilloxanthin . . . . .	84.8, 91.1	28.6, 26.2
Lycoxanthin . . . . .	136.0, 167.8	46.0, 48.2
Hydroxy- <i>P</i> 481 (? rhodovibrin) . . .	12.8, 10.0	4.3, 2.9
Demethylated spirilloxanthin . . . .	0, 4.2	0, 1.2
(?) Lycophyll . . . . .	2.9, 4.3	1.0, 1.2
Total . . . . .	295.9, 348.2	
Total pigment concentration (mg./g. dry wt.) . . . . .	1.68, 2.19	

## The effect of diphenylamine

Diphenylamine, which inhibits both chlorophyll and carotenoid production in *Rsp. rubrum* and stimulates production of the more saturated polyenes (GOODWIN and OSMAN, 1954) was found to have a similar effect on our *Chromatium* sp. The visual appearance of diphenylamine cultures of *Chromatium* sp., varied from almost completely colourless to blue-green. The polyene distribution in these different coloured cultures is complex. In all cases the members of the phytofluene series, phytoene, phytofluene and neurosporene were detected and identified by comparison with authentic specimens from diphenylamine cultures of *Ph. blakesleeanus* (GOODWIN, 1952, 1955);  $\zeta$ -carotene, or a very closely related compound was also present.

Also present were polyenes, not previously observed in diphenylamine cultures of *Ph. blakesleeanus* or *Rsp. rubrum*. Their phasic and adsorptive properties indicate that they contain one hydroxyl group and they have chromophoric systems identical with  $\zeta$ -carotene and neurosporene. A



compound very similar to the latter has been observed in a *R. spheroides* mutant (R. Y. STANIER, private communication). No compounds similarly related to phytoene or phytofluene were observed. Three other unidentified polyenes occurred in traces.

The blue green colour of some diphenylamine cultures of *Chromatium* sp., is due to almost complete inhibition of lycoxanthin associated with a much less intense inhibition of bacteriochlorophyll synthesis.

### Attempts at synthesizing lycoxanthin in washed suspensions

A number of experiments in which washed diphenylamine cells of *Chromatium* spp. were resuspended anaerobically in phosphate buffer in the light, did not reveal any synthesis of lycoxanthin. This is in marked contrast with *Rsp. rubrum* (GOODWIN and OSMAN, 1954).

### Summary

1. A *Chromatium* sp. produces mainly lycopene (rhodopurpurene), spirilloxanthin, lycoxanthin (rhodopin), and a new pigment provisionally termed P-481. Lycoxanthin is the major component. Traces of three other polyenes were also observed.

2. Diphenylamine cultures of *Chromatium* show reduced synthesis of the normal constituent pigments and stimulation of the synthesis of the more saturated phytofluene series: Two new polyenes of the phytofluene series were observed; they were monohydroxy derivatives with chromophoric systems similar to those of  $\zeta$ -carotene and neurosporene.

We thank the Medical Research Council for a grant towards laboratory expenses and the University of Liverpool for a Fellowship (D. G. L.).

### References

- ARCHICHOVSKII, V.: Bull. jardin, Imp. Botan. St. Petersburg 4, 81 (1904). — BUDER, J.: Jb. Bot. 58, 525 (1919). — GARTON, G. A., T. W. GOODWIN and W. LIJINSKY: Biochemic. J. 48, 154 (1951). — GOODWIN, T. W.: Biochemic. J. 50, 550 (1952); 62, 346 (1956a). — Arch. Mikrobiol. 24, 313 (1956b). — GOODWIN, T. W., D. G. LAND and H. G. OSMAN: Biochemic. J. 59, 491 (1955). — GOODWIN, T. W., and H. G. OSMAN: Biochemic. J. 53, 541 (1953); 56, 222 (1954). — GOODWIN, T. W., and M. E. SISSINS: Biochemic. J. 61, xiii (1955). — GOODWIN, T. W., and S. SRISUKH: Biochemic. J. 41, 69 (1950). — HAXO, F. T.: Arch. of Biochem. 20, 400 (1949). — KARRER, P., and E. JUCKER: Carotenoids (trs. E. A. BRAUDE), p. 171. London: Elsevier 1950. — KARRER, P., u. U. SOLMSSSEN: Helvet. chim. Acta 18, 1306 (1935); 19, 1019 (1936). — KARRER, P., u. T. TAKAHASHI: Helvet. chim. Acta 16, 1163 (1933). — KARRER, P., u. E. WÜRLER: Helvet. chim. Acta 26, 116 (1943). — LEVY, E., G. TEISSIER et R. WURMSER: Ann. de Physiol. 1, 298 (1925). — POLGAR, A., C. B. VAN NIEL and L. ZECHMEISTER: Arch. of Biochem. 5, 243 (1944). — STARR, M. P., and S. SAPERSTEIN: Arch. of Biochem. a. Biophysics 43, 157 (1953). — VAN NIEL, C. B.: Bacter. Rev. 8, 1 (1944). — VAN NIEL, C. B., u. J. H. C. SMITH: Arch. Mikrobiol. 6, 219 (1935). — WALLCAVE, L., and L. ZECHMEISTER: J. Amer. Chem. Soc. 75, 4495 (1953). — ZECHMEISTER, L.: Chem. Rev. 34, 267 (1944). — ZECHMEISTER, L., u. L. CHOLNOKY: Ber. dtsch. chem. Ges. 69, 422 (1936).



## Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos. Vorlagen für Diagramme sind in etwa doppelter Reproduktionsgröße erwünscht.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Selbständige kritische Sammelreferate über einzelne Gebiete sind erwünscht.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

**Einführung in die Atomphysik.** Von **Wolfgang Finkelburg**, Honorarprofessor an der Universität Erlangen. Vierte, verbesserte und ergänzte Auflage. Mit 266 Abbildungen. XI, 545 Seiten Gr.-8°. 1956. Ganzleinen DM 45.—

Inhaltsübersicht: Einleitung. — Atome, Ionen, Elektronen, Atomkerne, Photonen. — Atomspektren und Atombau. — Die quantenmechanische Atomtheorie. — Die Physik der Atomkerne. — Physik der Moleküle. — Festkörper-Atomphysik. — Tabelle der für die Atomphysik wichtigsten Konstanten und Beziehungen. — Sachverzeichnis.

... Finkelburgs Einführung in die Atomphysik ist eines der inhaltsreichsten Bücher, die in den letzten Jahrzehnten geschrieben worden sind. Für den Studenten und den Physiker ist es eine Fundgrube von Anregungen und gleichzeitig ein Nachschlagewerk, in dem man nicht nur eine kurze Schilderung des Gegenstandes, sondern auch zugleich die wesentlichen Literaturhinweise findet. Für den eiligen Leser, der sich nur kurz informieren möchte, oder der den Gegenstand schon einigermaßen zu kennen glaubt, sind die wesentlichen Gesichtspunkte in Kursivdruck hervorgehoben. Dies ist wirklich „Dienst am Kunden“. Eine große Zahl zwar einfacher, aber höchst instruktiver Abbildungen erleichtern die Lektüre.

Man würde Finkelburgs schönem Werk nicht gerecht werden, wenn man nur seinen Inhalt beachtet. Es liegt zwar nahe, daß bei wissenschaftlichen Werken die Qualität der sprachlichen Darstellung hinter dem Inhalt zurücktritt und deshalb nur selten eine Würdigung findet. Es gibt aber wissenschaftliche Werke, denen man nicht ihres Inhalts wegen ein hohes Niveau zusprechen darf, sondern die auch wegen der Klarheit ihres Ausdrucks und der Eleganz ihres Stiles als literarische Erzeugnisse gewertet werden können. Man kann ruhig vom Stil der naturwissenschaftlichen Literatur sprechen und Finkelburg ist ein Meister dieses Stiles.

Professor Weizel-Bonn in „Physikalische Blätter“



# Fortschritte der Botanik

Begründet von Fritz von Wettstein. Unter Zusammenarbeit mit mehreren Fachgenossen und mit der Deutschen Botanischen Gesellschaft herausgegeben von Professor Dr. Ernst Gäumann, Zürich, und Professor Dr. Otto Renner, München.

Siebzehnter Band:

## Bericht über das Jahr 1954

Mit 99 Abbildungen. VI, 890 Seiten Gr.-8°. 1955. DM 125.—; Ganzleinen DM 128.—

Inhaltsübersicht: **Morphologie: Morphologie und Entwicklungsgeschichte der Zelle.** Von Professor Dr. L. Geitler, Wien. — **Morphologie einschließlich Anatomie.** Von Professor Dr. W. Troll und Professor Dr. H. Weber, Mainz. — **Entwicklungsgeschichte und Fortpflanzung.** Von Professor Dr. K. Steffen, Marburg/Lahn. — **Submikroskopische Morphologie.** Von Privat-Dozent Dr. K. Mühlethaler, Zürich. — **Systemlehre und Pflanzengeographie: a) Systematik und Phylogenie der Algen.** Von Professor Dr. B. Schussnig, Jena. — **b) Systematik und Stammesgeschichte der Pilze.** Von Dozent Dr. H. Kern, Zürich. — **c) Systematik der Flechten.** Von Dr. J. Poelt, München. — **d) Systematik der Moose.** Von Dr. J. Poelt, München. — **e) Systematik und Stammesgeschichte der Pteridophyten.** Von Dr. J. Poelt, München. (Folgt in Band XVIII.) — **f) Systematik und Stammesgeschichte der Spermatophyten.** Von Privat-Dozent Dr. H. Merxmüller, München. (Folgt in Band XVIII.) — **Paläobotanik.** Von Professor Dr. K. Mägdefrau, München. — **Systematische und genetische Pflanzengeographie.** Von Professor Dr. F. Firbas, Göttingen, und Privat-Dozent Dr. H. Merxmüller, München. — **Ökologische Pflanzengeographie.** Von Professor Dr. H. Ellenberg, Hamburg. — **Ökologie.** Von Professor Dr. Th. Schmucker, Hann.-Münden. — **Physiologie des Stoffwechsels: Physikalisch-chemische Grundlagen der Lebensprozesse (Strahlenbiologie).** Von Professor Dr. W. Simonis, Hannover. — **Zellphysiologie und Protoplasmatik.** Von Professor Dr. H. J. Bogen, Braunschweig. (Folgt in Band XVIII.) — **Wasserumsatz und Stoffbewegungen.** Von Professor Dr. B. Huber, München, und Dr. L. Bauer, Tübingen. — **Mineralstoffwechsel.** Von Professor Dr. H. Burström, Lund (Schweden). — **Stoffwechsel organischer Verbindungen I (Photosynthese).** Von Professor Dr. A. Pirson, Marburg/Lahn. — **Stoffwechsel organischer Verbindungen II.** Von Professor Dr. K. Paech †, Tübingen. — **Physiologie der Organbildung: Vererbung: a) Genetik der Mikroorganismen.** Von Professor Dr. Dr. H. Marquardt, Freiburg/Br. (Folgt in Band XVIII.) — **b) Genetik der Samenpflanzen.** Von Professor Dr. C. Harte, Köln. — **Cytogenetik.** Von Professor Dr. J. Straub, Köln. — **Wachstum.** Von Dozent Dr. J. Reinert, Tübingen. — **Entwicklungsphysiologie.** Von Professor Dr. A. Lang, Los Angeles (Californien). — **Physiologie der Fortpflanzung und Sexualität.** Von Privat-Dozent Dr. H. F. Linskens, Köln. — **Viren: a) Pflanzenpathogene Viren.** Von Oberreg.-Rat Dr. E. Köhler, Braunschweig. — **b) Bakteriophagen.** Von Dozent Dr. Dr. W. Weidel, Tübingen. — **Sachverzeichnis.**

**SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG**

Diesem Heft liegen zwei Prospekte des Springer-Verlages, Berlin-Göttingen-Heidelberg, bei

Verantwortlich für den Anzeigenteil: Günter Holtz, Berlin W 35, Reichpietschufer 20. — Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck: Wiesbadener Graphische Betriebe GmbH — Printed in Germany